



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

DIEGO JOSÉ LIRA TORRES

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO TNF E DE SEUS RECEPTORES EM PORTADORES
DE CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

Recife
2023

DIEGO JOSÉ LIRA TORRES

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO TNF E DE SEUS RECEPTORES EM PORTADORES
DE CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Recife

2023

T693a	Torres, Diego José Lira. Avaliação do papel do TNF e de seus receptores em portadores de cardiopatia chagásica crônica / Diego José Lira Torres – 2023. 179 p. Orientadora: Virgínia Maria Barros de Lorena Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2023. Inclui referências, apêndices e anexos.	
616.988	CDD (23.ed.)	UFPE (CCS 2023 - 264)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

DIEGO JOSÉ LIRA TORRES

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO TNF E DE SEUS RECEPTORES EM PORTADORES
DE CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Aprovado em: 31/08/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra Virginia Maria Barros de Lorena (Examinadora Interna e presidente)
Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ)

Prof.^a Dra. Libia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes (Examinadora externa)
Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ)

Prof.^a Dra. Michelle Christiane da Silva Rabello (Examinadora externa)
Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ)

Dedico esta tese a minha família que tanto me ajudou nessa jornada (minha mãe, pai, irmã e esposa). Dedico ao meu primo Lili e minha amada Catarina (*in memoriam*). Dedico este trabalho a todos os portadores com doença de Chagas crônica que participaram desse estudo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a DEUS, pois sem ele nada disso seria possível. Eu sempre pedi e orei muito. Minha fé em DEUS sempre prevaleceu e abençoou.

À minha mãe, Edna Lira, por todo apoio e incentivo até aqui. Mãe, o que seria de mim sem seus conselhos, sem seu apoio e sem seu colo. Eu sempre quis te ver feliz. Essa conquista é para você, que abdicou de muita coisa por mim. Te amo eternamente.

À minha esposa, Alexia, por ter sido luz onde tinha escuridão, por ser meu guia nos momentos que mais me senti perdido, por ser meu alicerce quando tudo parecia desmoronar. Baby, minha vida, meu amor por você é eterno. Você é a pessoa que escolhi passar meus dias. Obrigado por dividir sua jornada comigo.

À minha irmã, Ana Karina, minha mãe. Agradeço todos os dias por DEUS ter me abençoado com uma irmã como você, sinto muita falta das nossas convivências, das nossas tardes de cinema e do seu carinho. Mãe, te desejo toda felicidade desse mundo.

Ao meu pai, Edmundo, por todo apoio durante esse curso de doutorado. Pai, agradeço muito pela sua calma quando a tempestade parecia tomar conta.

Aos meus familiares paternos: Vovó Joaquina, Nem, Edilson, Edna e Duda.

Aos meus familiares maternos: Tia Francisca, obrigado por ter sido muito tempo um apoio importante na minha estadia em Recife, que sua bondade e luz possaabençoar a todos. Tia Elza, Tia Neuman, Tia Maria, Tia Eva e Tia Rita. Minhas primas Lu, Alyne e Andressa.

Ao meu primo, José Lyndemberg (*in memoriam*): Lili, crescemos juntos, nos divertimos muito juntos, nossas aventuras ficarão marcadas pra sempre na minha memória. De onde você estiver, saiba que você foi um guerreiro aqui na Terra. Apreendi com você a persistir e a sobreviver. Te amarei eternamente. Sinto muito sua falta.

Aos meus amigos de infância: Marlos, Jordy, Adriana e Catarina (*in memoriam*). Minha cat, minha japa, como foi dura sua partida, você faz muita falta aqui. Eu agradeço por ter dividido quase 30 anos da minha vida ao seu lado. Todos os momentos que vivemos ficará guardado, como naqueles discos de rock que eu gravava para você. Minha irmã, te amo eternamente.

Aos meus colegas do LIMP: Jr, Leylla, José, Victor, Cíntia e Ana. Obrigado pela colaboração de vocês no desenvolvimento desse trabalho. Ao meu trio, Mi Barros e Kamila, que ficaram juntas comigo durante várias madrugadas na execução dos experimentos. Meninas, rimos e choramos muito, mas valeu a pena cada lágrima. Sem vocês eu não teria conseguido. Obrigado por todo apoio emocional.

A Mineo, por todos os ensinamentos e conselhos. Mineozinho, obrigado.

A Neide, Rafinha, Jô, Yury e Debs por terem sido fiéis companheiras nessa jornada científica. Só nós sabemos das dificuldades. Amo muito todas vocês.

À melhor orientadora: Virginia Lorena, minha vi. Vi, saiba que sou muito grato por tudo que você fez, olhando para trás e fazendo uma retrospectiva eu não me arrependo em nada de ter te procurado, ainda me lembro da nossa primeira reunião. Eu tenho muito orgulho de ter sido orientado por você e de ter recebido todos os seus ensinamentos. Te amo para sempre. Encerramos mais um ciclo juntos, mas espero nunca te abandonar.

Aos meus colegas dos meus antigos vínculos profissionais: Jack, Clécinha, Lulu, Ivan, Cea, Tiago, Angel, Gir e Érika.

À Idjane, uma grande colega que o CAV me presenteou. Id meu amor, obrigado por todos seus conselhos e ajuda. Você é uma pessoa iluminada.

À Janaina, Monica e Reginaldo que foram meus orientadores durante o estágio à docência e meus professores da graduação.

À Casa de Chagas, local de coleta e atendimento dos portadores da doença de Chagas. Obrigado a todos os profissionais: Jade, Damares, Alci, Taine, Dra. Piedade, Dra. Glória, Dra. Cistina, Dr. Wilson

À FIOCRUZ por todo suporte técnico.

À CAPES por todo apoio financeiro. À programa de pós-graduação em medicina tropical por ter permitido o desenvolvimento desse projeto. Aos colaboradores que financiaram esse trabalho com a compra de alguns insumos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse grande sonho e desse grande passo. Meus sinceros agradecimentos.

Com carinho, Diego Lira.

RESUMO

Considerada uma citocina chave na imunopatologia em portadores crônicos, o TNF está envolvido em vários processos durante a resposta imune. Esta citocina se liga a dois receptores, o receptor de TNF do tipo 1 (TNFR1 ou CD120A) e o receptor de TNF do tipo 2 (TNFR2 ou CD120B). O TNFR2 tem expressão mais restrita em células imunes com mecanismos regulatórios, enquanto o TNFR1 tem participação em mecanismos inflamatórios. Ainda não está claro quais mecanismos estão envolvidos na evolução dos portadores de formas clínicas assintomáticas para sintomáticas, mas acredita-se que a resposta imune tenha importante contribuição. Dessa forma este trabalho teve como objetivo avaliar citocinas do perfil regulatório (IL-4 e IL-10) e inflamatório (TNF, IFN- γ , IL-2 e IL-6) em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes crônicos apresentando as formas clínicas indeterminada - IND (n=17) cardíaca leve - CARD1 (n=13) e cardíaca grave - CARD2 (n=23), tratadas *in vitro* com dois bloqueadores de TNF, Adalimumabe (ADA) e Etanercepte (ETA) isolados ou em associação com Benzonidazol (Bz). Além de avaliar a expressão de TNFR1 e TNFR2 em linfócitos TCD4+, TCD8+, T reg, Monócitos totais e subpopulações (Clássicos, Intermediários e Não clássicos), além de correlacionar esses marcadores com a Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo (FEVE). Os resultados apontam que o ADA foi mais competente em bloquear TNF (comparado ao ETA), em todos os grupos, mas com seus níveis muito mais reduzidos no grupo CARD 2. ETA diminuiu os níveis de TNF de forma estatística apenas no grupo CARD 2. IFN aumentou no grupo CARD 2 após tratamento com ETA em relação ao ADA. IL-4 teve seus níveis diminuídos quando tratados por ambas as drogas. IL-2 diminuiu em células de portadores CARD 2 quando comparado ao grupo NEG após tratamento por ambas as drogas. Associação com o Benzonidazol diminuiu níveis de IL-2/TNF e aumentou IL-4. Ao avaliar a expressão de TNFR1 e TNFR2, os achados apontam aumento da expressão de TNFR1 em monócitos totais nos grupos IND e CARD2 quando comparado a células T reg e linfócitos TCD8+. Já o TNFR2 aumentou em células TCD8+ quando comparado aos monócitos totais na forma CARD2. Entre as subpopulações de monócitos, os não clássicos têm níveis maiores de TNFR1 em todas as formas clínicas quando comparado ao clássico, já TNFR2 tem níveis maiores em monócitos intermediários quando comparado aos clássicos. Houve um aumento de linfócitos TCD4+TNF+, TCD8+TNF+ em portadores de CARD2 quando

comparado aos CARD1. Já nas subpopulações de monócitos, monócitos clássicos e intermediários expressaram níveis menores de TNF em portadores da forma clínica cardíaca quando comparado a cardiopatia não chagásica e portadores de IND. Mesmo esses receptores aumentando em portadores crônicos, houve uma correlação de células TCD8+ expressando TNFR1 ao dano cardíaco. Em resumo, concluímos que nossos dados reforçam a participação do TNF e de seus receptores na cardiopatia grave e traz perspectivas no uso desses bloqueadores no tratamento imunológico da doença de Chagas, já que o uso do Benzonidazol é extremamente limitado nesses pacientes.

Palavras-chave: receptores do fator de necrose tumoral; fator de necrose tumoral alfa; cardiomiopatia chagásica; inibidores do fator de necrose tumoral; citocinas

ABSTRACT

Considered a key cytokine in immunopathology in chronic carriers, TNF is involved in several processes during the immune response. This cytokine binds to two receptors, the TNF receptor type 1 (TNFR1 or CD120A) and the TNF receptor type 2 (TNFR2 or CD120B). TNFR2 has more restricted expression in immune cells with regulatory mechanisms, while TNFR1 participates in inflammatory mechanisms. It is still unclear which mechanisms are involved in the evolution of patients from asymptomatic to symptomatic clinical forms, but it is believed that the immune response has an important contribution. Thus, this study aimed to evaluate regulatory (IL-4 and IL-10) and inflammatory (TNF, IFN- γ , IL-2 and IL-6) cytokines in peripheral blood mononuclear cell culture supernatant (PBMC) of chronic patients with the clinically undetermined - IND (n=17) mild cardiac - CARD1 (n=13) and severe cardiac - CARD2 (n=23) forms, treated in vitro with two TNF blockers, Adalimumab (ADA) and Etanercept (ETA) alone or in association with Benznidazole (Bz). In addition to evaluating the expression of TNFR1 and TNFR2 in CD4+, CD8+, T reg lymphocytes, total monocytes and subpopulations (Classic, Intermediate and Non-classical), in addition to correlating these markers with the Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF). The results indicate that ADA was more competent in blocking TNF (compared to ETA) in all groups, but with much lower levels in the CARD 2 group. ETA statistically decreased TNF levels only in the CARD 2 group. IFN increased in the CARD 2 group after treatment with ETA relative to ADA. IL-4 had its levels decreased when treated by both drugs. IL-2 decreased in cells from CARD 2 carriers when compared to the NEG group after treatment with both drugs. Association with Benznidazole decreased levels of IL-2/TNF and increased IL-4. When evaluating the expression of TNFR1 and TNFR2, the findings point to an increase in the expression of TNFR1 in total monocytes in the IND and CARD2 form when compared to T reg cells and CD8+ lymphocytes. TNFR2 increased in TCD8+ cells when compared to total monocytes in the CARD2 form. Among monocyte subpopulations, non-classical ones have higher levels of TNFR1 in all clinical forms when compared to classic ones, while TNFR2 has higher levels in intermediate monocytes when compared to classic ones. There was an increase in CD4+TNF+, CD8+TNF+ in CARD2 carriers when compared to CARD1. In the subpopulations of monocytes, classical and intermediate monocytes expressed lower levels of TNF in patients with the clinical cardiac form when compared to non-chagasic heart disease and the IND form. Even

though these receptors increased in chronic carriers, there was a correlation between CD8+ cells expressing TNFR1 and cardiac damage. These data reinforce the participation of TNF and its receptors in severe heart disease and bring perspectives on the use of these blockers in the immunological treatment of Chagas disease, since the use of Benznidazole is extremely limited in these patients. In addition to the search for biomarkers of clinical evolution in the disease.

Keywords: tumor necrosis factor receptors; necrosis factor alpha tumor; chagas cardiomyopathy; tumor necrosis factor inhibitors; cytokines

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 –	Distribuição de casos estimados da doença de Chagas no mundo	25
Figura 2 –	Ciclo de transmissão vetorial do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 3 –	Evolução da doença de Chagas nos portadores infectados	29
Figura 4 –	Apresentações clínicas mais frequentes na cardiopatia chagásica crônica	31
Figura 5 –	Resposta imunológica nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas humana	40
Figura 6 –	Funções do fator de necrose tumoral	42
Figura 7 -	Processo de síntese e interação do TNF com TNFR.....	44
Figura 8-	Mecanismo de ação dos anti-TNF.....	46
Quadro 1	Lista de terapias anti-TNF disponíveis e sua indicação.....	47
Figura 9-	Efeitos do bloqueio de TNF na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	52

Materiais e Métodos

Figura 10 –	Seleção dos pacientes	56
Quadro 2 -	Características dos anticorpos utilizados nos ensaios para avaliação dos receptores de TNF (CD120A e CD120B) em linfócitos T CD4, CD8, T regulatórios e monócitos.....	59
Quadro 3 -	Caracterização das subpopulações de células.....	60
Figura 11-	Estratégia de análise dos linfócitos TCD4+ e TCD8+.....	62
Figura 12-	Estratégia de análise dos linfócitos T regulatórios (T _{reg})....	62
Figura 13-	Estratégia de análise de monócitos totais e de células CD16+.....	64
Figura 14-	Estratégia de análise das subpopulações de monócitos.....	65
Figura 15-	Condições de cultivo de PMBC's submetidas ao tratamento com drogas imunossupressoras e Benzonidazol.....	66

Resultados

Artigo 1

Figura 1 -	A) Os níveis de TNF não se alteram em pacientes com doença de Chagas e permanecem abaixo do limite de detecção. B) e C): Aumento dos receptores solúveis de TNF no soro de pacientes com doença de chagas.....	77
Figura 2 -	Ambos os receptores aumentam no soro de pacientes com doença de Chagas com forte correlação na forma clínica mais grave.....	78

Artigo 2

Figura 1 -	Alteração nos níveis de TNF e IL-4 em sobrenadantes de cultura sem estímulo (C) de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes saudáveis (NEG) e com doença de Chagas (IND, CARD1 e CARD2) e cardiopatia idiopática (IDIOP).....	96
Figura 2 -	Redução drástica dos níveis de TNF em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de portadores crônicos da doença de Chagas (IND, CARD1 e CARD2), saudáveis (NEG) e cardiopatas idiopáticos (IDIOP) tratados com Adalimumabe (ADA: 5µg/mL) e Etanercepte (ETA: 10 µg/mL) (A e B). Curva de produção dos níveis de TNF após bloqueio do ADA (C).....	98
Figura 3	Alteração nos níveis de outras citocinas do perfil pró-inflamatório Th1 (IFN-γ e IL-2) e anti-inflamatório Th2 (IL-4 e IL-10) em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de portadores de doença de Chagas (IND, CARD1 e CARD2), saudáveis (NEG) e cardiopatas idiopáticos (IDIOP) tratados com Adalimumabe (ADA: 5µg/mL) e	

	Etanercepte (ETA: 10 µg/mL). Comparação por condição de cultivo (A,B,C,D e E).....	100
Figura 4 -	. Impacto da associação dos bloqueadores de TNF, Adalimumabe e Etanercepte, com Benzonidazol nos níveis de citocinas do perfil Th1 e Th2 em diferentes condições de cultivo celular. C: apenas célula; BZ (Benznidazol: 1µg/mL); A+BZ (Adalimumabe (5µg/mL) + Benzonidazol); E+BZ (Etanercept: 10 µg/mL + Benzonidazol).....	103
Figura 5	Predominância do perfil Th2 sobre Th1 após associação de bloqueadores de TNF e Benznidazol. Níveis aumentados de IL-4 em células de portadores de CARD1 (A) na condição de cultivo Adalimumabe + Benznidazol. Diminuição de IL-2 e TNF em CARD1 e CARD 2 (B e C), na condição de cultura tratada com Adalimumabe e Etanercepte associado a Benznidazol.....	104
Figura 6 -	. Correlação positiva e moderada entre o percentual de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (%FEVE) e IL-4 em pacientes com a forma CARD2.....	105
Figura 7 -	Resumo dos principais achados sobre a dinâmica de produção de diferentes citocinas inflamatórias e regulatórias tratadas com inibidores do TNF isoladamente ou associados ao Benzonidazol em células mononucleares de pacientes com cardiopatia chagásica crônica.....	112

Artigo 3

Figura 1-	Comparação da expressão de TNFR1 (A, B, C) e TNFR2 (D, E, F) por Linfócitos, Monócitos e Células CD16+.
-----------	---

	Gráfico radar evidenciando a dispersão dos receptores (G-L).....	128
Figura 2 -	Comparação da expressão de TNFR1 (A, B, C) e TNFR2 (D, E, F) em subpopulações de monócitos. Gráfico radar evidenciando a dispersão dos receptores (G-L).....	130
Figura 3-	Expressão intracelular de TNF em Linfócitos e subpopulações de monócitos por grupo de portadores. Barras indicam mediana.....	131
Figura 4-	Estratégia de gate para seleção da população de linfócitos. Fig. A-C: expressão de receptores e citocinas intracelulares em linfócitos TCD4+. Fig. D-G: expressão de receptores e citocinas em linfócitos TCD8+.....	133
Figura 5-	Estratégia de gate para seleção da população de Linfócitos T reg. Fig. A: células T reg. Fig B: Expressão de receptores.....	134
Figura 6-	Estratégia de gate para seleção da população de monócitos totais e células CD16+. Fig. A, C: expressão de receptores em monócitos totais. Fig. B, D: expressão de receptores em células CD16+.....	136
Figura 7-	Estratégia de gate para seleção das subpopulações de monócitos, baseado na expressão de CD14 e CD16. Fig. A, D, G: expressão de receptores e citocinas em monócitos clássicos. Fig. B, E, H: expressão de receptores e citocinas em monócitos intermediários. Fig. C, F, I, J: expressão de receptores e citocinas em monócitos não clássicos.....	138
Figura 8-	Correlação entre diferentes populações de células	

	expressando receptores de TNF e percentual da fração de ejeção ventricular esquerda (%FEVE).....	140
Figura 9-	Correlação entre receptores de TNF em diferentes populações celulares e o TNF.....	142
Figura 10-	Correlação entre os receptores de TNF em populações de células.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas e epidemiológicas da população de estudo.....	57
Artigo 1		
Tabela 1 -	Caracterização clínica e epidemiológica dos pacientes.....	75
Tabela 2 -	Correlação entre a concentração sorológica de sTNFR1 e sTNFR2 em portadores da doença de Chagas crônica.....	76
Artigo 2		
Tabela 1 -	Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais da população de estudo.....	92
Artigo 3		
Tabela 1 -	Características clínicas e epidemiológicas da população de estudo.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celcius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, <i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BD	<i>Becton Dickinson</i>
CARD	Forma Cardíaca
CBA	<i>Citometric Beads Array</i>
CCC	Cardiopatía Chagásica Crônica
CD	Grupos de diferenciação, <i>Cluster of differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DC	Doença de Chagas
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
ELISA	Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPI	Epimastigota
FADD	Proteína associada a Fas com o domínio da morte, <i>Fas-Associated Protein With Death Domain</i>
FASL	Fas ligante, <i>Fas ligand</i>
FEVE	Fração de Ejeção Ventricular Esquerda
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FSC	Dispersão frontal, <i>Forward Scatter</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFN-γ	Interferon gama

IL	Interleucina
IND	Forma Indeterminada
iNOS	Óxido Nítrico-Sintase Induzida, <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
MIF	Intensidade Média de Fluorescência, <i>Mean Intensity of Fluorescence</i>
mRNA	RNA Mensageiro, <i>Messenger RNA</i>
mTNF- α	TNF- α Transmembrana, <i>Transmembrane TNF-α</i>
NI	Não infectado
NK	Célula Assassina Natural, <i>Natural-Killer</i>
PBMC	Célula Mononuclear de Sangue Periférico, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PE	Ficoeritrina, <i>Phycoerythrin</i>
RPM	Rotação por minuto
SRDC	Serviço de Referência em Doença de Chagas
SSC	Dispersão Lateral, <i>Side Scatter</i>
STNF	Fator de Necrose Tumoral solúvel, <i>Soluble Tumor Necrosis Factor</i>
STNFR	Receptor solúvel do fator de necrose tumoral, <i>Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	Temperatura Ambiente
TACE	Enzima Conversora de TNF Alfa, <i>TNF Alpha Converting Enzyme</i>
TCLE	Termo de consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Linfócito T auxiliar 1, <i>T helper 1</i>
Th2	Linfócito T auxiliar 2, <i>T helper 2</i>
TNFRSF	Superfamília Do Receptor Do Fator De Necrose Tumoral, <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa, <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TNFR	Receptores do fator de necrose tumoral, <i>Tumor Necrosis Factor Receptors</i>
TRADD	Proteína do domínio de morte associada ao TNFR1, <i>TNFR1, Associated Death Domain Protein</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

UPE

Universidade de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas	24
2.2	Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
2.3	Aspectos clínicos da doença de Chagas	27
2.4	Aspectos imunes da doença de Chagas	32
2.4.1	Imunidade Inata.....	32
2.4.2	Imunidade adaptativa.....	35
2.5	Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFRs)	40
2.6	Inibidores de TNF.....	45
2.7	Receptores de TNF na infecção pelo <i>T.cruzi</i>	48
3	JUSTIFICATIVA.....	53
4	OBJETIVOS.....	54
4.1	Objetivo geral	54
4.2	Objetivos específicos	54
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
5.1	População de estudo	55
5.2	Coleta de sangue	57
5.3	Confirmação da sorologia para a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
5.4	Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	58
5.5	Imunofenotipagem.....	58
5.5.1	Aquisição e estratégia de análise.....	60
5.6	Tratamento de cultura celular com drogas imunossupressoras	65
5.7	Quantificação de citocinas do perfil Th1 e Th2 em sobrenadantes de cultura.....	66
5.8	Análise estatística	67
5.9	Considerações éticas.....	67

6	RESULTADOS.....	69
6.1	Artigo 1. É uma correlação negativa entre sTNFR1 e TNF em pacientes com doença de Chagas crônica a chave para progressão clínica?.....	69
6.2	Artigo 2. Adalimumab e Etanercept isolados ou associados com Benzonidazol impactam na produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 em células mononucleares de portadores de doença de Chagas crônica.....	87
6.3	Artigo 3. Populações de células expressam níveis diferenciais de Receptores TNFR1 e TNFR2, mas Linfócitos TCD8+ expressando TNFR1 são associados ao dano cardíaco em portadores de cardiopatia chagásica crônica.....	120
7	CONCLUSÃO	152
	REFERÊNCIAS	154
	APÊNDICE A.....	169
	APÊNDICE B.....	171
	APÊNDICE C – IS A NEGATIVE CORRELATION BETWEEN STNFR1 AND TNF IN PATIENTS WITH CHRONIC CHAGAS DISEASE THE KEY TO CLINICAL PROGRESSION?.....	173
	ANEXO A.....	179

1. INTRODUÇÃO

Os mecanismos envolvidos na evolução clínica dos pacientes crônicos na doença de Chagas permanecem obscuros. Acredita-se que a resposta imunológica associada à persistência parasitária possa contribuir para o desenvolvimento da forma cardíaca. O TNF é uma das citocinas chave na imunopatologia da doença tendo sua ativação quando ligado a seus receptores (TNFR1/2) e inibição quando ligada a receptores solúveis (sTNFR1/sTNFR2). Avaliar a expressão dos receptores de TNF de membrana bem como das formas solúveis desses receptores, pode esclarecer os mecanismos inflamatórios exercidos pelos indivíduos portadores da cardiopatia chagásica crônica.

Ao avaliar os receptores solúveis, Mocelin et al. (2005) não encontraram nenhuma diferença estatística significativa nos níveis plasmáticos de sTNFR1 entre portadores crônicos da doença de Chagas e indivíduos sem infecção. O pequeno número de indivíduos no estudo (n=28) e a técnica (ELISA) utilizada pelos autores podem ter sido vieses para o estudo. Em contrapartida, Torres et al. (2019) verificaram um aumento de sTNFR1/2 no soro de 132 portadores crônicos quando comparado aos não infectados, porém nenhum dos trabalhos mensurou os níveis de IL-10 uma vez que esta citocina está envolvida na regulação de receptores de TNF (JOYCE et al., 1994; SEDGER; MCDERMOTT, 2014).

González et al. (2018) verificaram que os níveis de TNFR2 foram maiores em células de sangue periférico de portadores com a forma indeterminada e cardíaca quando comparada aos não infectados. Por outro lado, os autores não encontraram diferença estatisticamente significativas nos níveis plasmáticos de TNF, nem de TNFR1 entre os portadores crônicos das diferentes formas clínicas ou quando estes foram comparados aos indivíduos do grupo controle.

Há controvérsias no papel do TNF em portadores crônicos. TNF se encontra elevado em pacientes com CCC e está diretamente relacionado com o grau de acometimento cardíaco (FERREIRA et al., 2003; MOCELIN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2012). Já Pisseti et al. (2009) viram que as dosagens plasmáticas de IFN- γ , IL-10 e de TNF não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre controles e indivíduos soropositivos. Em contrapartida, IL-10 aumentou em portadores crônicos quando comparado aos saudáveis, e este

aumento chama a atenção para as propriedades imunomodulatórias com regulação do processo inflamatório e escape do parasita (PISSETI et al., 2009). IL-10 atua inibindo a atividade pró-inflamatória do TNF de maneira indireta pelo aumento de receptores solúveis e diminuição de receptores transmembranares ou de maneira direta pela inibição da liberação do TNF (JOYCE et al., 1994). Análises em sobrenadante de cultura revelaram que apenas o estímulo com mitógeno foi essencial para a produção de TNF em indivíduos infectados. Mesmo após estímulo dependente (com antígenos de *Epimastigota* (Epi) não houve diferença estatisticamente significativas entre portadores das formas cardíaca e indeterminada (LORENA et al., 2008; PISSETI et al., 2011). Esses achados revelam a importância do estudo do TNF e seus mecanismos em portadores crônicos.

No estudo de Bilate *et al.* (2007) foi demonstrado que a ausência da sinalização do TNF- α (pela inibição com Etanercepte) e a infecção são importantes fatores aceleradores da insuficiência cardíaca em animais infectados, uma vez que a função ventricular e fração de ejeção ventricular esquerda (%FEVE) foram diminuídas após o tratamento com inibidor de TNF. Em contrapartida, a terapia com Infliximabe mostrou ser promissora no tratamento de camundongos infectados cronicamente. Pereira et al. (2014) viram que houve diminuição de TNFR1 em células T após o tratamento com Infliximabe. O bloqueio interrompeu a retroalimentação positiva da sinalização TNF/TNFR1, e dessa forma levou a diminuição da ativação celular induzida pelo TNF e de citocinas pró-inflamatórias bem como o aumento (PÉREZ et al., 2009) ou manutenção (PEREIRA et al., 2014) de IL-10. Essas drogas atualmente são utilizadas no tratamento de condições inflamatórias e auto-imunes em humanos. Não há estudos que avaliem qual perfil de citocinas e frequência dos receptores, em células provenientes dos portadores crônicos da doença de Chagas após bloqueio com essas drogas.

Entender a relação desses receptores com a gravidade da doença de Chagas, ou ainda se esses receptores têm algum papel relevante em mecanismos que auxiliam ou inibem atividades deletérias do TNF, contribuiria para o melhor entendimento da imunopatogênese na doença. E dessa forma ainda poderiam tornar-se biomarcadores imunológicos de gravidade e/ou prognóstico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas

Dentre as 13 doenças mais negligenciadas do mundo estão as doenças tropicais causadas por protozoários (HOTEZ et al., 2008; WHO, 2013). As enfermidades causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae*, que são as Leishmanioses e a Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas, configuram grande impacto na expectativa de vida da população e afeta indivíduos com potencial produtivo, sobretudo em países subdesenvolvidos, com repercussão considerável na morbidade e mortalidade (HOTEZ et al., 2008; WHO, 2019).

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* tem maior influência na morbimortalidade nas Américas quando comparada a outras doenças parasitárias (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Habitualmente é confinada a áreas rurais pobres da América Central e do Sul, onde a transmissão vetorial, por várias espécies de triatomíneos, é a principal via de contaminação. Mas existem outras formas de transmissão que não necessariamente dependem diretamente do vetor. Sendo estas mais relatadas em regiões não endêmicas como o aumento da migração, transfusão de sangue, transplante de órgãos e transmissão vertical (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; DIAS; AMATO NETO, 2011; MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015; NÓBREGA et al., 2009; PEREZ-MOLINA; MOLINA, 2017).

A globalização da doença de Chagas tem se tornado um desafio mundial pela migração de pessoas de países endêmicos para áreas não endêmicas, afetando mais de 8 milhões de pessoas ao redor do mundo, como: Estados Unidos, Austrália, Japão e países da Europa (SCHMUNIS; YADON, 2010; WHO, 2019).

É endêmica em 21 países da América Latina, desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina e do Chile, onde a Bolívia e Brasil tem a maior taxa de prevalência, e constitui um dos grandes problemas de saúde pública por causar mais de 10.000 mortes anuais, superando os casos de malária (WHO, 2019). Além disso, aproximadamente 70 milhões de pessoas estão sob risco de infecção (BILBE, 2015; WHO, 2013).

No Brasil a infecção por via oral tem sido a principal via de contaminação e tem provocado surtos agudos, principalmente na região Norte (1156 casos) e Nordeste (24 casos), totalizando 1190 casos de doença de Chagas aguda no país

entre 2012 e 2016, alertando para a implementação de medidas sanitárias urgentes (BRASIL, 2019; COSTA-OLIVEIRA et al., 2023).

Figura 1 Distribuição de casos estimados da doença de Chagas no mundo.



Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al.* (2012).

Apesar de mais de um século de sua descoberta, muitos aspectos permanecem obscuros e podem estar longe de serem elucidados pela extrema heterogeneidade da doença como tempo de evolução e período de incubação, reconhecimento insatisfatório de mortalidade, dados limitados sobre sequelas e ausência de dados fora dos países endêmicos (PINHEIRO et al., 2017). A falha no diagnóstico, ausência de biomarcadores de evolução clínica e principalmente drogas mais eficientes para o tratamento refletem o quão negligenciada e grave problema de saúde pública mundial é a doença de Chagas (STANAWAY; ROTH, 2015).

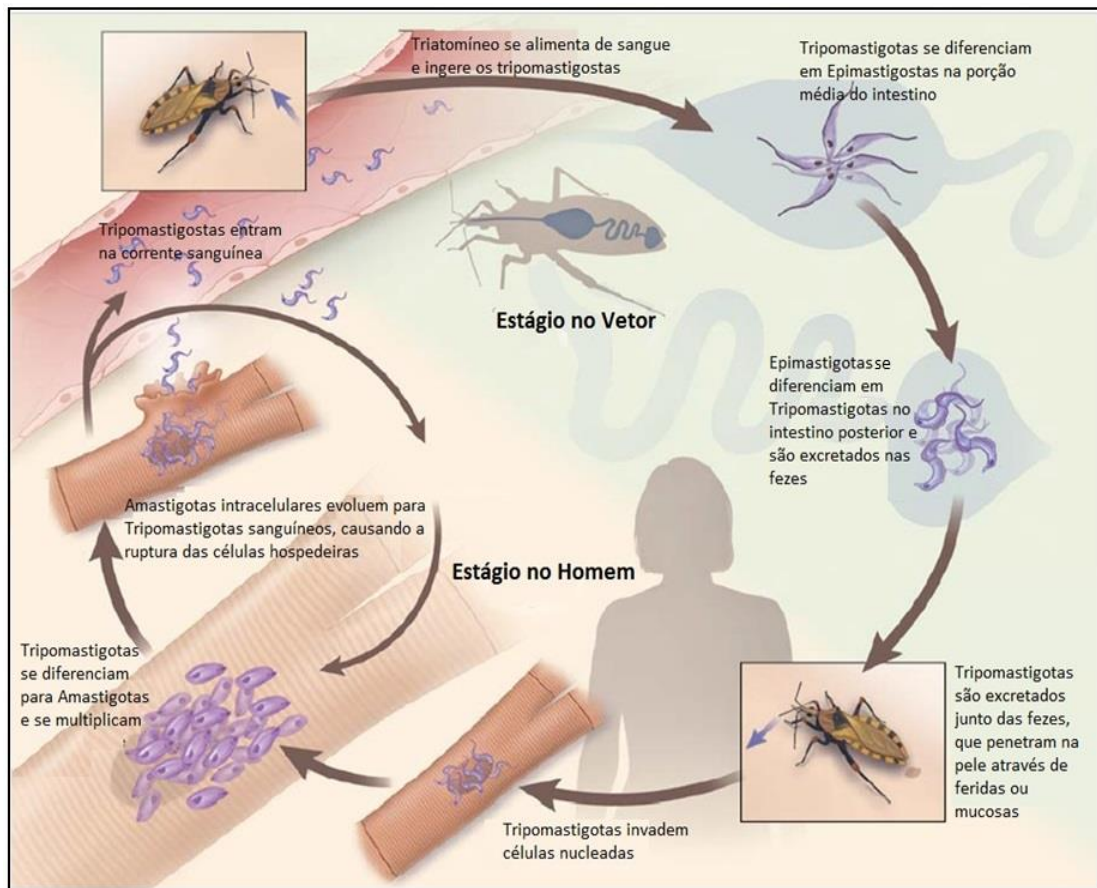
2.2 Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário que possui ciclo biológico heteroxênico vivendo em hospedeiros vertebrados: o homem e mais de 150 espécies de mamíferos, assumindo ciclos silvestres e domésticos. Nos hospedeiros invertebrados, infecta diversas espécies de insetos hematófagos, com espécies de maior competência vetorial o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* responsáveis pela transmissão vetorial em áreas endêmicas (ARGOLO *et al.*, 2008; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010).

Para o sucesso da infecção, há alguns importantes fatores no elo vetor, protozoário e humano que podem variar de espécie para espécie como intervalo da picada do triatomíneo; a eliminação das excretas contaminadas pelo parasito; número de parasitas nas fezes e intensidade do prurido (COURA, 2007). Os triatomíneos se infectam, quando ao fazer o repasto sanguíneo em animais ou humanos infectados, ingerem formas tripomastigotas circulantes, que se transformam em epimastigotas para se multiplicarem, e em tripomastigotas metacíclicas (forma infectante) novamente, na porção final do tubo digestivo desses insetos vetores (Figura 2) (BERN, 2015; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

A contaminação humana pelo vetor ocorre quando o triatomíneo infectado ao fazer o repasto sanguíneo, elimina excretas próximo ao local da picada. Nas fezes e/ou urina encontra-se a forma tripomastigota metacíclica que ganha o acesso sistêmico quando o indivíduo fricciona o local da picada podendo parasitar várias células, iniciando um novo ciclo de replicação (ARGOLO *et al.*, 2008; BERN, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2006). No interior das células o tripomastigota evolui para a fase amastigota, que é a forma replicante do parasita (Figura 2).

Figura 2 Ciclo de transmissão vetorial do *Trypasonoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de Bern (2015).

2.3 Aspectos Clínicos da doença de Chagas

A doença de Chagas é categorizada de acordo com os aspectos clínicos e laboratoriais em fases aguda e crônica (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012). O período de incubação pode variar de acordo com a forma de contágio, variando de 20 a 40 dias pelo contágio com hemoderivados contaminados, 7 a 15 dias para transmissão vetorial e 2 a 22 dias para infecção oral (BOCCHI *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2015).

Alguns sinais clínicos relacionados à transmissão vetorial são evidentes e fortes indicadores de infecção aguda na doença, como o sinal de Romaña, que indica contaminação pela mucosa ocular e chagoma de inoculação que indica contaminação pela pele, onde o local fica edemaciado. Além dos sinais e sintomas gerais, como febre, aumento de baço, fígado e linfonodos, outras manifestações, mais raras, podem acometer os indivíduos e levar ao óbito como meningoencefalia

e/ou insuficiência cardíaca caracterizando uma doença aguda grave (MATTU *et al.*, 2013; RASSI; RASSI; MARCONDE DE REZENDE, 2012; RASSI; RASSI; MARINETO, 2010).

Apesar de o Brasil ter recebido a certificação de eliminação vetorial em 2006 pela Organização Mundial da Saúde, a manifestação aguda pela transmissão vetorial decresceu, porém, contaminação pela via oral, reagudização da doença em pessoas vivendo com HIV/AIDS ou que fazem uso de imunossupressores repercute em quadro agudo grave com grande impacto na morbimortalidade (BERN; MARTIN; GILMAN, 2011).

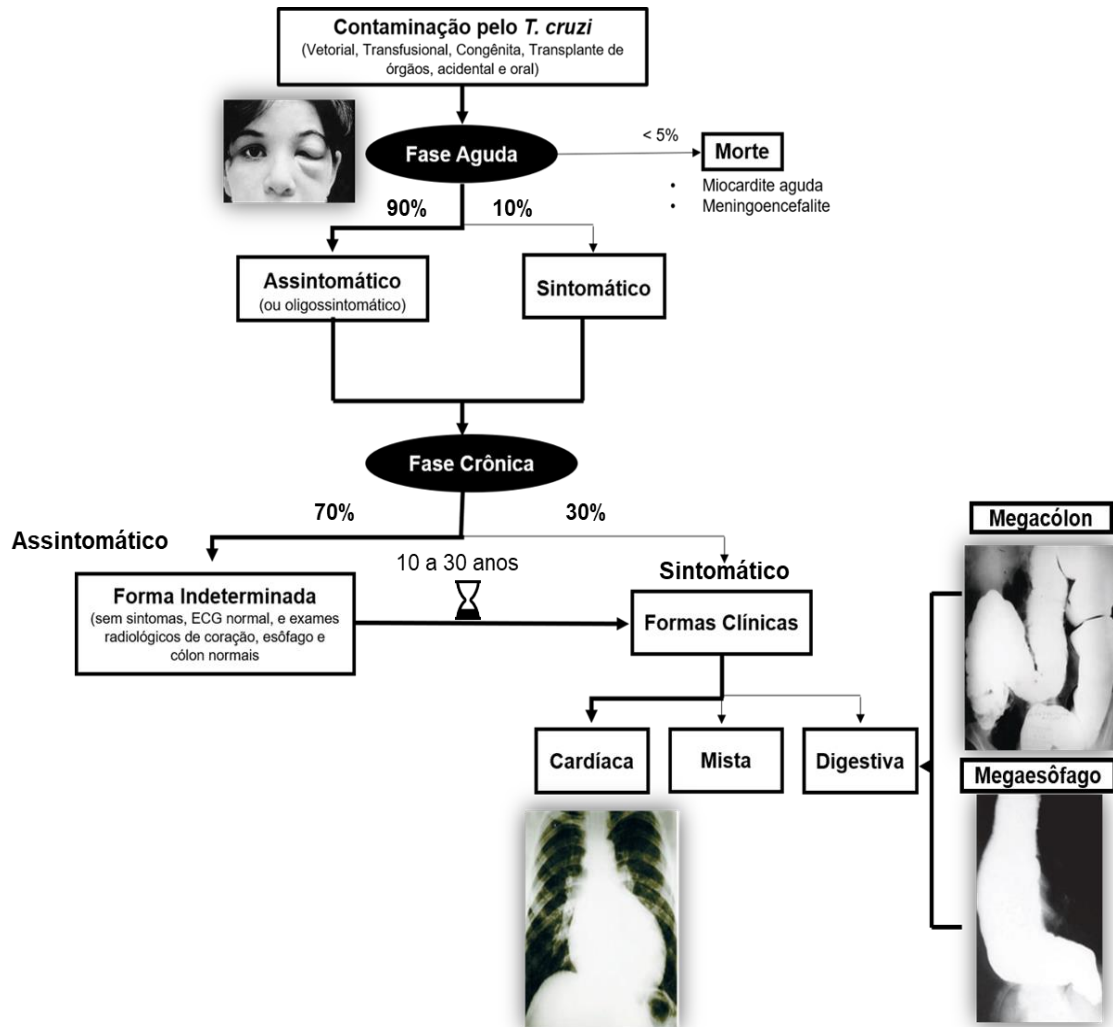
A fase aguda na maioria dos indivíduos é assintomática e cursa com parasitemia no início da infecção. A sintomatologia é relacionada a carga parasitária, uma vez que nos indivíduos que se contaminam oralmente pela ingestão de alimentos contaminados com fezes de barbeiros infectados, o índice de mortalidade e sintomas é alto devido a elevada carga parasitária, implicando numa fase crônica mais grave (DIAS, 1982).

A fase crônica da doença, iniciada após quatro a dez semanas, é responsável pela maior parte das consequências clínico-patológicas do portador e é caracterizada pelo intenso infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares, diferentes graus de fibrose e persistência do parasita, podendo culminar em doença grave, pois como consequência leva a disfunção vascular e/ou neurológica (MACHADO *et al.*, 2012a; RIBEIRO *et al.*, 2012). Além de desencadear resposta imune adaptativa, importante no controle parasitário.

As formas clínicas da doença de Chagas crônica se dividem em forma assintomática, conhecida também como forma indeterminada responsável pela maioria dos casos (aproximadamente 60% dos infectados). Forma sintomática na qual, o indivíduo apresenta manifestações relacionadas com o coração (forma cardíaca) (30% dos infectados) e/ou esôfago e cólon (forma digestiva e/ou mista) e sistema nervoso central e periférico (raro) (DIAS *et al.*, 2016) (Figura 3).

Figura 3. Evolução da doença de Chagas nos portadores infectados.

Fonte: Adaptado de Rassi, Rassi e Rassi (2007) e Rassi *et al.* (2017). Nota: As setas em negrito



significam uma maior probabilidade de evolução

Na forma indeterminada (IND) o portador tem as mesmas expectativas de vida de uma pessoa sem a doença. Esses indivíduos apresentam testes sorológicos reagentes, mas possuem exames de imagem normais e ausência de sintomas clínicos (DIAS *et al.*, 2016; RIBEIRO; ROCHA, 1998; WHO, 2015). Uma proporção desses indivíduos desenvolverá (ou não) a forma cardíaca após décadas de evolução, o que torna a doença de Chagas um grande desafio, pois não há biomarcadores de evolução clínica (DIAS *et al.*, 2016).

A forma digestiva é representada por alterações na motilidade e absorção do esôfago e trato gastrointestinal (RASSI *et al.*, 2017). Essas alterações são devido à perda neuronal que varia em graus e repercute no não fechamento dos esfíncteres

que resulta em acúmulo de alimento e dilatação (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

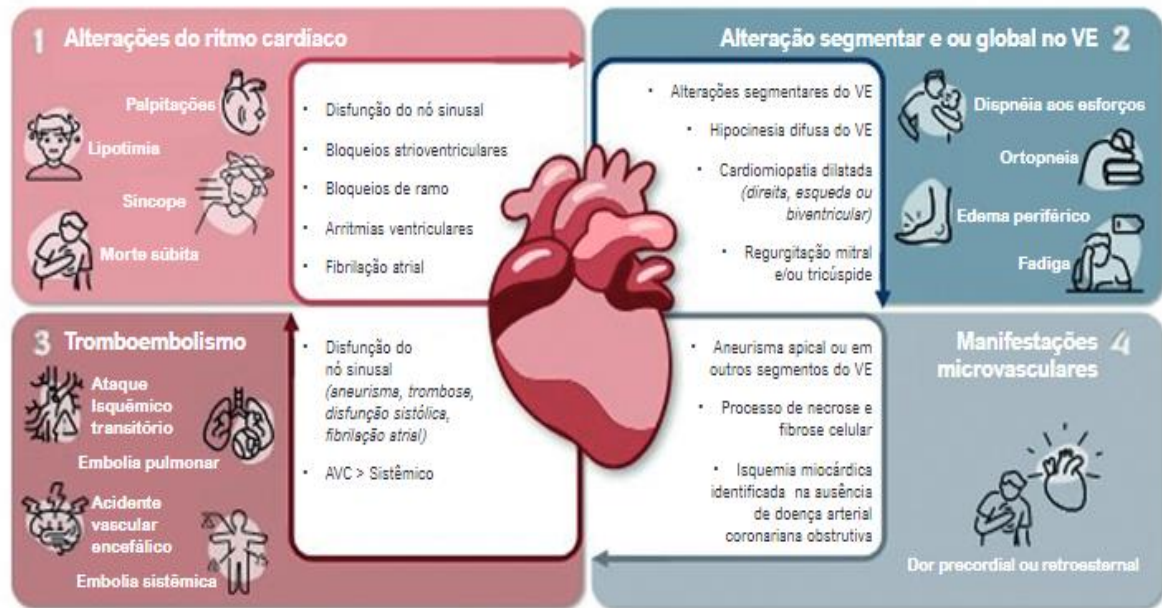
A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é definida como uma miocardiopatia dilatada relacionada à extensa fibrose e que resulta na progressiva perda de função contrátil do órgão, podendo culminar com insuficiência cardíaca (DIAS *et al.*, 2016; MARIN-NETO *et al.*, 2007; RICHARDSON *et al.*, 1996).

A disautonomia cardíaca, que é um funcionamento inadequado do sistema nervoso autônomo relacionado à perda neuronal, a hipótese microvascular, mecanismos imunopatológicos e persistência do parasita sendo os dois últimos mais bem aceitos são considerados mecanismos conhecidos que contribuem para a patogênese cardíaca (CASTRO *et al.*, 2011).

A forma cardíaca é a manifestação crônica mais grave e a maior responsável pela mortalidade na doença (RASSI; RASSI; LITTLE, 2000). Geralmente os principais achados, que podem coexistir no mesmo paciente, incluem anormalidades no sistema de condução, bradiarritmias, taquiarritmias, aneurismas apical, insuficiência cardíaca e morte súbita que dependerá do dano do miocárdio (Figura 4) (RASSI *et al.*, 2017; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

O *T. cruzi* promove, direta ou indiretamente, danos no tecido especializado de condução, miocárdio contrátil e no sistema nervoso intramural levando a inflamação, necrose e fibrose com repercussão hemodinâmica e cardiovascular (CASTRO *et al.*, 2011). Além disso, o intenso infiltrado inflamatório frente ao parasita contribui para sua diminuição tanto a nível sistêmico quanto a nível tecidual. Porém devido à persistência do parasita na fase crônica, uma resposta imune celular é montada levando a exaustivo dano tecidual sem reparos (GUTIERREZ *et al.*, 2009).

Figura 4. Apresentações clínicas mais frequentes na cardiopatia chagásica crônica.



Fonte: Alves et al., (2023). Nota: VE: Ventrículo esquerdo. AVC: Acidente Vascular Cerebral

A CCC é classificada em estágios, A, B, C e D de envolvimento cardíaco, de acordo com a I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011). O estágio A (ou seja, sem cardiopatia) descarta as alterações digestivas, corresponde a forma indeterminada, com eletrocardiograma (ECG) e ecocardiograma (ECO) normais além de ausência de insuficiência cardíaca. O estágio B é subdividido em B1 e B2, onde em B1 o indivíduo apresenta alterações no ECG e percentual da fração de ejeção ventricular esquerda (%FEVE) acima de 45% apresentada no ECO o que difere do paciente B2 que apresenta %FEVE menor que 45%. O paciente pertencente ao grupo C e D já apresentam insuficiência cardíaca, com sintomas prévios ou atuais. A FEVE também é relacionada com o diâmetro ventricular (DV), ambas dadas no ECO. Quanto maior o diâmetro do coração e menor FEVE pior o prognóstico (CASTRO *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2015).

Não se sabe ao certo quais os mecanismos envolvidos na evolução do portador da forma indeterminada para a forma sintomática, podendo durar décadas para que o indivíduo tenha os sinais e sintomas dessa fase. Dessa forma os indicadores clínicos ou sorológicos em pacientes que progridem para a fase determinada da doença (por exemplo, sintomáticos e muitas vezes fatais) permanecem pouco claros (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015). No entanto,

manifestações da fase crônica, se presente, persistem, e em alguns pacientes se tornam mais graves com o tempo. Não há marcadores laboratoriais bem definidos, características do paciente ou medidas clínicas que predizem de forma confiável a progressão da doença de Chagas (RASSI *et al.*, 2017).

2.4 Aspectos imunes da doença de Chagas

Os estudos em modelos animais foram essenciais e contribuíram com achados relevantes acerca da imunologia na doença de Chagas, principalmente na fase aguda, contudo vários aspectos como o evento desencadeador, ainda não são claros no estudo imunológico na doença humana (BRENER; GAZZINELLI, 1997; DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2009).

A resposta imune na doença de Chagas tem relação com a carga parasitária, vias de infecção, fatores de virulência do parasita, do hospedeiro e influência de fatores neuroendócrinos (MORROT *et al.*, 2016). Podendo ser benéfica no início da infecção e relacionada com controle da parasitemia, mas com prejuízos evidentes em portadores crônicos sintomáticos, sobretudo com a forma cardíaca.

Após a invasão do parasita e interação com as células, há uma forte ativação da resposta imune inata e adaptativa, que juntas atuam mas não são suficientes para eliminação completa do *T. cruzi*. Este protozoário adquiriu vários mecanismos de evasão do sistema imunológico como resultado de uma extensa história de coevolução entre parasita-hospedeiro (ACEVEDO, GIRARD, GÓMEZ, 2018).

2.4.1 Imunidade Inata

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa em hospedeiros vertebrados. Dentro desse tipo de resposta, o sistema complemento tem importante contribuição contra diferentes patógenos, em três vias de ativação: clássica, alternativa e das lectinas. Incluindo mais de 40 proteínas plasmáticas, o sistema complemento atua (convergindo para a formação da C3 convertase) de maneira indireta levando a opsonização e recrutamento de células fagocíticas ou diretamente levando a eliminação do *T. cruzi* pela formação de poros de ataque a membrana (MAC) em sua superfície (ACEVEDO, GIRARD, GÓMEZ, 2018).

A via das lectinas e via alternativa são importantes cascatas ativadas na infecção inicial pelo *T. cruzi*, sobretudo contra formas epimastigotas e algumas cepas de tripomastigotas metacíclicos (LIDANI et al.,2017). Porém este parasita pode inibir a ativação dessas vias através de algumas proteínas já bem caracterizadas como a proteína reguladora do complemento (TcCRP) e outras (LIDANI et al.,2017).

Além do sistema complemento, Monócitos/Macrófagos, Neutrófilos e Células dendríticas, são considerados importantes fagócitos recrutados nas defesas inatas do hospedeiro na doença de Chagas, pois camundongos com depleção dessas células não sobreviveram diante da infecção pelo *T. cruzi*. Essas células expressam diferentes receptores que reconhecem padrões, expressos na superfície (*Toll Like Receptors* – TLR1,2,4,5 e 6) ou intracelulares (TLR 7,8 E 9) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP's) e ao dano (DAMP's) (DOLASIA et al., 2017).

Dentre os PAMP's do *T. cruzi* mais bem estudados e com capacidade de ativação das células, destacam-se: glicoproteínas tipo mucina (GPI), glicoinositolfolípideos (GILP'S) além de material nuclear como ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) que se ligam a TLR2, 4, 9 e 7, respectivamente. Esse reconhecimento dos diferentes PAMP's por fagócitos são importantes para indução de diferentes perfis de células e citocinas (BAFICA et al., 2011; CAETANO et al., 2011).

Pinto et al., 2018 verificaram a diminuição de TLR-2 em monócitos intermediários de portadores de doença de chagas na forma grave (CARD2) estimulados com antígenos de *T. cruzi*, assim como diminuição da expressão de TLR-4 em monócitos clássicos de portadores da forma indeterminada (IND). A regulação negativa desses receptores é um evento importante na redução da capacidade fagocitária e um mecanismo desenvolvido por portadores IND para controle da inflamação (PINTO et al., 2018).

Os monócitos são classificados de acordo com a expressão de CD14 e CD16 em clássicos (CD14 ++ CD16-) onde apresentam alta capacidade fagocítica e dessa forma apresentam perfil pró-inflamatório, correspondem a maior parte dos monócitos (aproximadamente 90%). Em contrapartida, monócitos não clássicos (CD14 + CD16 ++) apresentam perfil anti-inflamatório. Já os monócitos intermediários (CD14 ++ CD16 +) expressam níveis mais altos de MHC-II. (PINTO et al., 2018).

Monócitos são uma importante fonte de mediadores inflamatórios em pacientes com doença de Chagas crônica, pois a depleção dessas células em cultura regulou negativamente a proliferação celular, além de diminuir citocinas pró e anti-inflamatórias em portadores de DC (LUNA-GOMES et al., 2014). PINTO et al. (2018) avaliaram a expressão de CD86 em subpopulações de monócitos; clássicos (CD14⁺⁺ CD16⁻), não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) e intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) após estímulo *in vitro* com antígenos de tripomastigotas e verificaram que essa expressão foi maior em monócitos de pacientes IND quando comparados aos indivíduos não infectados (NI). Essa expressão influenciou um perfil pró-inflamatório nesses pacientes

Macrófagos e células dendríticas são células apresentadoras de antígenos (APC's) que ao fagocitar e apresentar antígenos do *T. cruzi* para Linfócitos *naive*, começam a montar uma resposta, pela produção de citocinas que contribuem para formação e polarização para uma ampla diversidade de perfis pró e anti-inflamatórios, sobretudo IL-12. Na deficiência do gene que produz IL-12 é possível verificar a importância dessa citocina no controle da parasitemia, mortalidade e impacto na produção de outras citocinas, como TNF e IFN- γ . (SILVA et al., 2003).

A apresentação de antígenos por células dendríticas foi avaliada em experimentos humanos. Ocorreu uma diminuição do complexo principal de histocompatibilidade (HLA I e II), bem como a expressão do co-receptor CD40, o que levou a diminuição dos níveis de IL-12 e TNF após contato com fatores solúveis do parasita (PAMP's). Dessa forma, o *T. cruzi* modula a funcionalidade das células dendríticas, afetando sua capacidade de ativar mecanismos da resposta imune adaptativa (OVERTVELT et al., 1999; ACEVEDO, GIRARD, GÓMEZ, 2018).

As células *natural killer* (NK) tem papel muito importante no combate a vírus e outros parasitas intracelulares como o *T. cruzi*. Essas células, diferentemente das outras da imunidade inata, eliminam os patógenos através da toxicidade mediada por seus grânulos, num mecanismo similar aos linfócitos TCD8. Mas, é importante destacar que na infecção pelo *T. cruzi*, o papel das células NK no controle da carga parasitária tem mais a ver com a morte do parasita extracelular do que com a eliminação das células infectadas por ele, uma vez que foi observado um padrão de liberação de grânulos independente de perforina que é um grânulo usado por Linfócitos CD8 para perfurar células infectadas. (LIEKE et al., 2004).

São reguladas e ativadas por IL-12, IL-15 e IL-18 que induzem a um pico de produção de IFN- γ (logo após a infecção) que ativa macrófagos e influencia na diferenciação de Linfócitos T virgens em direção ao perfil T *helper* 1 (Th1) (CARDILLO et al., 1996; ACEVEDO, GIRARD, GÓMEZ, 2018). Em humanos, a expressão de genes relacionados à atividade citotóxica das células NK foi encontrado aumentado em portadores assintomáticos e cardiopatas leves e diminuídos em pacientes com cardiopatia grave. Subpopulações de células NK foi avaliada em portadores de doença de chagas crônica. Células NK maduras (predominantemente citotóxica) aumentou em portadores assintomáticos em comparação a portadores cardíacos, esses dados sugerem uma manutenção da ausência de sintomas nesses pacientes. (FERREIRA et al., 2015; VITELLI-AVELLAR et al., 2005).

2.4.2 Imunidade adaptativa

Linfócitos T e B são células que fazem parte da resposta imune adaptativa. Esse tipo de resposta é dividido em imunidade celular e imunidade humoral. Linfócitos B são um importante elo entre imunidade inata e adaptativa, pois além de apresentar antígenos para outras células, se diferenciam em plasmócitos e secretam anticorpos além de citocinas.

A persistência do parasita é uma grande complicação na imunopatologia chagásica, pois mesmo tendo produção de anticorpos anti-*T. cruzi* responsáveis no controle da parasitemia na fase aguda, eles não o eliminam efetivamente. A resposta deficiente de anticorpos tem relação com a grande variação de antígenos do parasita que conseqüentemente impacta na ativação de clones de linfócitos B específicos, produção e maturação de anticorpos neutralizantes e apoptose de Linfócitos B na medula óssea (PITCOVSKY et al., 2002).

Além disso, muitos estudos ressaltam a existência de mecanismos auto-imunes como decorrência da infecção com maior presença na fase crônica, ainda que anticorpos anti- laminina foi detectado em humanos na fase aguda, sugerindo que mecanismos de auto reatividade podem começar desde a fase inicial da doença. Mimetismo molecular entre parasita e hospedeiro leva a auto-anticorpos. Dentre essas moléculas estão fragmentos de proteínas do *T. cruzi* como a B13, proteínas P ribossomais e FL-160 que são similares a cadeia pesada de miosina

humana, receptores muscarínicos e proteína neuronal, respectivamente (BONNEY et al., 2015; CUNHA-NETO et al., 2011).

Linfócitos B são fundamentais para o estabelecimento de populações de Linfócitos T de memória específicos para o *T. cruzi*, pois na ausência de células B, resultou numa produção deficiente de linfócitos TCD4+ e TCD8+ além de Th1, Th17 e T regulatórias (T_{reg}) (SERRÁN et al., 2017; CARDILLO et al., 2007). Há discordâncias quanto a frequência de células B (CD19+) circulantes em humanos, estudos mencionam o aumento dessa população durante a fase aguda tardia e início da fase crônica e outros que não encontraram diferenças dessas frequências entre portadores crônicos quando comparado aos saudáveis (SATHLER- AVELLAR et., 2003; FARES et a., 2013).

Entretanto Fernandez et al., 2014 demonstraram que a infecção crônica pelo *T. cruzi* altera a distribuição de algumas subpopulações de células B no sangue periférico estando relacionado a desregulação de Linfócitos TCD4+ provocada pelo parasita. Há uma diminuição em células B de memória, CD19+CD27+IgD-; CD19+CD27+CD128+ e aumento de células B não convencionais, o que impacta na incapacidade das células B de produzirem anticorpos IgG+. (FERNANDEZ et al., 2014).

Outra população de células B, as B regulatórias (B_{reg}) estão aumentadas em portadores crônicos. Esta célula tem sido cada vez mais estudada na infecção pelo *T. cruzi*. Produzem IL-10, IL-35 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e são relacionadas com a supressão de células T patogênicas. No entanto, não está claro o papel dessa população de Linfócitos B na doença de Chagas, se tem efeito benéfico pela contenção da inflamação ou maléfica por favorecer a presença do parasita (ACEVEDO, GIRARD, GÓMEZ, 2018; FARES et al., 2013).

Os Linfócitos T efetores (TE) são gerados após reconhecimento do antígeno pelo receptor de células T (TCR) via MHC I e II. A resposta dessas células é classificada em três fases: iniciação e expansão, resolução e contração e memória imunológica. Na fase de iniciação os Linfócitos multiplicam-se e se expandem em células TE. Moléculas de superfície como CD69, CD25, CD40L E CTLA-4 tem sua expressão aumentada, além de receptores de quimiocinas. As TE podem produzir uma citocina ou várias, sendo classificadas como T monofuncionais e polifuncionais, respectivamente (LAIDLAW et al., 2016; ACEVEDO, GIRARD, GÓMEZ, 2018).

Ainda que, em portadores crônicos da doença de Chagas, os níveis circulantes de Linfócitos T ativados produtores de citocinas tem uma frequência aumentada. Sua resposta proliferativa é baixa, após estímulo, *in vitro*, com mitógeno. Em células de indivíduos saudáveis que foram infectadas com antígenos do *T. cruzi* também impacta negativamente na capacidade proliferativa (DUTRA et al., 2008; ACEVEDO et al., 2017; GIRALDO et al., 2018).

Linfócitos T são importantes mantenedores da baixa parasitemia em portadores crônicos, uma vez que durante a co-infecção pelo HIV, ocorre uma rápida progressão da doença de Chagas (VAIDIAN; WEISS; TANOWITS, 2004). Apesar de haver um aumento dessa população celular na circulação dos portadores, os linfócitos T parecem não ser tão responsivos a estímulos, uma vez que sua atividade proliferativa é diminuída assim como seus receptores de ativação (ACEVEDO et al., 2017; GIRALDO et al., 2013; MACHADO et al., 2012b).

Essa baixa capacidade efetora pode ser atribuída a um aumento de uma população celular denominada de linfócitos T de memória central (TMC), revelando estado de ativação crônica (FIUZA et al., 2009) aliada a infecção persistente por *T. cruzi* promovendo exaustão, que pode contribuir para a progressão da doença em indivíduos infectados a longo prazo. Assim, foi verificado que há respostas polifuncionais de células T em crianças em estágios iniciais de infecção crônica, porém, essa resposta polifuncional não é vista em adultos infectados a longo prazo, passando então a ter uma resposta monofuncional (ALBAREDA et al., 2013).

Os linfócitos TCD8⁺ são ativados mediante interação do TCR com MHC I em APCs e citocinas provenientes de células T *helper* (principalmente IFN- γ). Os linfócitos T ativados conseguem eliminar a célula infectada com amastigotas, tornando-se T citotóxico ricos em grânulos contendo granzima e perforina (WILLIAMS et al., 2007). Essa população de células tem uma participação muito importante na infecção pelo *T. cruzi*, pois a depleção em camundongos infectados não sobrevivem na fase aguda (TARLETON, 1990).

Em portadores de cardiopatia chagásica grave foi constatada uma diminuição na frequência de Linfócitos T CD8⁺ circulantes quando comparado ao grupo assintomático e com cardiopatia leve. Os autores sugerem que pode haver uma prevenção na progressão da sintomatologia cardíaca (ALBAREDA et al., 2006). Porém essas células também têm relação ao dano tecidual em portadores de formas clínicas sintomáticas, como cardíaca e digestiva. Os infiltrados inflamatórios nesses

portadores são ricos em Linfócitos TCD8+ com expressão aumentada de moléculas citolíticas, como granzima, sugerindo dano. (DUTRA et al., 2008; LANNES-VIEIRA et al., 2003).

As células T CD4+ são importantes na secreção de citocinas que modulam a atividade de outras células, principalmente macrófagos, DCs e outros linfócitos. São componentes principais de infiltrados de lesões cardíacas, sugerindo participação na resposta ao *T. cruzi*. Ainda assim, não está claro a compreensão de sua participação na doença de Chagas tal qual células CD8+ (ACEVEDO et al., 2017; GIRALDO et al., 2018).

No que diz respeito à proteção, estudos sugerem que é preferível uma resposta coordenada entre perfis Th1 e Th2, com predominância dos mecanismos efetores via Th1 para o controle e eliminação parasitária. (HOFT et al., 2005). Assim, indivíduos que apresentam a forma cardíaca expressam níveis exacerbados de linfócitos do perfil pró-inflamatório, Th1, com consequente atenuação de uma resposta anti-inflamatória, representada pelo perfil de linfócitos Th2. Esse desequilíbrio revela a complexidade da resposta imune contra o *T. cruzi* e sugere que os focos inflamatórios incessantes, característicos da doença crônica, repercutem a produção plasmática de células e citocinas (CUNHA-NETO et al., 2005).

As citocinas produzidas pelos linfócitos ativados desempenham papel importante na regulação da resposta imune, principalmente pela família da IL-12, e são implicadas na resistência a infecção e evolução da doença de Chagas (BRODSKYN; BARRAL-NETO, 2000; ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018). Estudos em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) revelam que após estímulo derivados do parasita, *in vitro*, há produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e o perfil de citocinas produzido pelas células está relacionado com as formas clínicas da doença (CUELLAR et al., 2008; DUTRA et al., 1997; GOMES et al., 2003; SOUZA et al., 2004, 2007).

As análises de perfis de citocinas pró e anti-inflamatório sugerem que a IL-10 está mais elevada em indivíduos com a forma IND quando comparada aos da forma CARD, sugerindo que esta citocina esteja controlando a morbidade da doença por impedir a progressão para as formas clínicas sintomáticas (ARAÚJO et al., 2011; COSTA et al., 2009; GOMES et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2012; SOUZA et al., 2004).

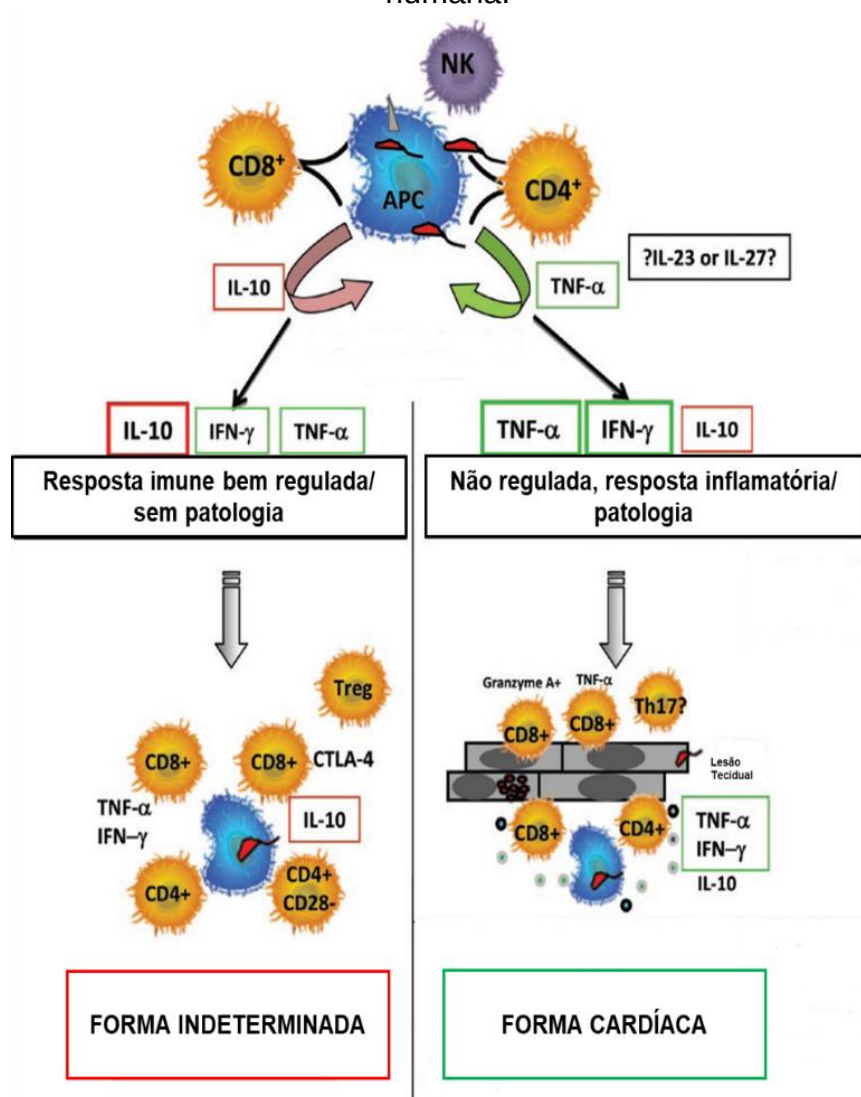
Em contrapartida, citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α estão em níveis mais elevados em portadores da forma cardíaca e possivelmente, representam piora da função cardíaca (Figura 5). Além disso, níveis elevados de TNF- α estavam presentes em indivíduos portadores da cardiopatia que foram a óbito por acidente vascular cerebral (AVC), sugerindo que níveis elevados de TNF- α aumenta o risco de desenvolvimento de AVC (GUEDES *et al.*, 2016; TALVANI *et al.*, 2004).

As células T reguladoras (T_{reg}) tem função crucial no sistema imunológico pois além de ter relação com mecanismos de tolerância, reconhecendo autoantígenos, também participa na modulação de outras células, diminuindo a atividade de células T com potencial patogênico ou danoso ao hospedeiro via IL-10 e TGF- β . No contexto da doença de chagas e diante de todo o exposto, essa população de linfócitos está aumentada em portadores assintomáticos quando comparado aos sintomáticos sobretudo a forma cardíaca (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2011).

É importante destacar que linfócitos T_{reg} de portadores com a forma cardíaca leve e grave tem a capacidade regulatória modulada negativamente. Como exposto anteriormente, portadores que apresentam essa forma clínica parecem ter uma reposta desbalanceada (GUEDES *et al.*, 2012).

ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ, 2018 são enfáticos ao pontuar: “é tentador especular que uma estratégia de intervenção imunológica poderia ajudar (se não curar) portadores cronicamente infectados”. É notável o grande envolvimento da resposta imune nesses pacientes, ficando claro os mecanismos de desregulação. Imunoterapias tem sido cada vez mais utilizadas em pacientes onde a resposta imune é deletéria, e nos portadores crônicos esse tipo de foco deve ser levado em consideração principalmente colocando o TNF como alvo de bloqueio.

Figura 5. Resposta imunológica nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas humana.



Fonte: Adaptado de Dutra *et al.* (2009).

2.5 Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFRs)

Nas pesquisas iniciais envolvendo câncer, achava-se que extratos de bactérias levavam a regressão de certos tumores em animais e humanos. Inicialmente pensou-se ser o Lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular das bactérias gram - o responsável por isso, mas foi constatado que as células tumorais subcutâneas entravam em necrose por um determinado fator necrosante, provenientes de macrófagos, em resposta ao próprio LPS. Mais tarde, esse fator

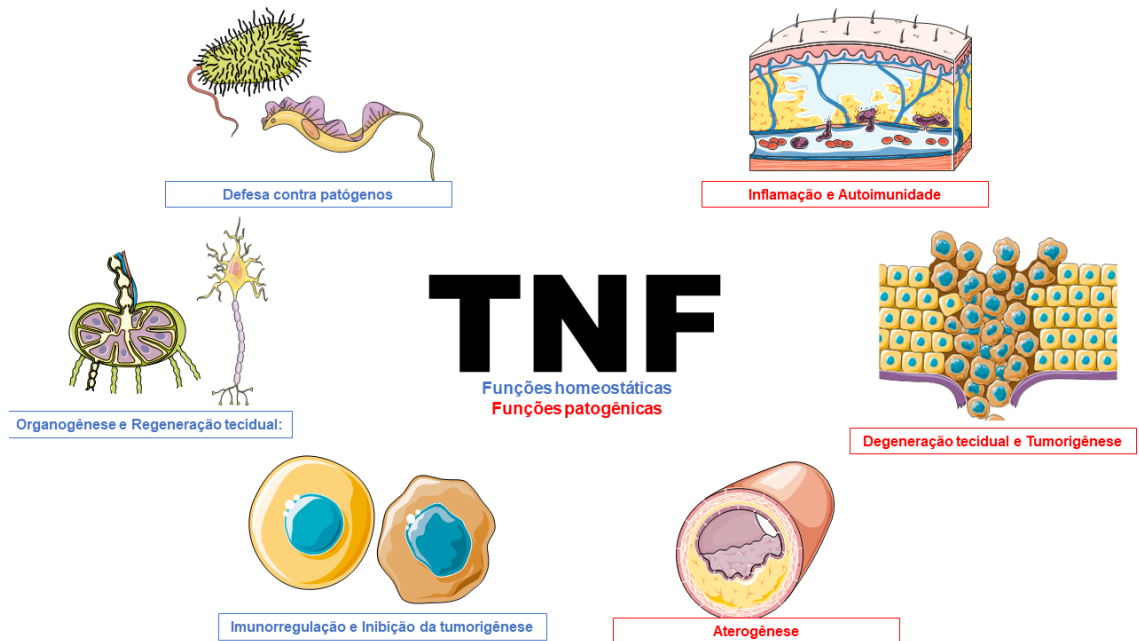
necrosante foi chamado de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (COLEY, 1910; 1944; CARSWELL et al., 1975)

De maneira geral, faz parte de uma superfamília (TNFSF) composta por 19 proteínas estruturalmente similares que se liga a uma ampla variedade de receptores (TNFRSF) composta por 29 receptores. O TNF- α ou membro da superfamília TNF 2 (TNFSF2) ou simplesmente TNF (também já foi denominado de Caquectina, por ter sido associado a caquexia, e Linfotoxina) é uma citocina que desempenha várias funções na imunidade inata e adaptativa. Em condições fisiológicas sua produção e funcionalidade tem tendência limitada, porém quando sua produção é aumentada e descontrolada é associado com doenças inflamatórias, autoimunes, crônicas e geração de alguns tipos de câncer. Por ter produção aumentada no tecido adiposo, na obesidade, também é conhecido como Adipocina (TRACEY et al., 1990; BODMER et al., 2002; LOCKSLEY et al., 2002; MATHIS et al., 2011; SETHI; HOTAMISLIGIL, 2021).

O TNF é produzido por uma diversidade de células imunes e não imunes, sendo a primeira citocina a ter seus níveis aumentados minutos após qualquer lesão, acompanhado mais tardiamente de IL-1 e IL-6, que também são dependentes da liberação previa de TNF. Sendo, portanto, uma importante molécula do sistema imunológico (MONACO et al., 2014).

Considerado portando altamente inflamatório e mais pleiotrópica, ou seja, desempenhando funções em diversos tipos celulares (FONG et al., 1989). Atualmente seu papel é associado a várias patologias infecto parasitárias, autoimunes, neoplásicas, inflamatórias e metabólicas (SEDDER; MCDERMOTT, 2014). (Figura 6)

Figura 6. Funções do fator de necrose tumoral (TNF)



Fonte: KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2015

O TNF existe como duas formas de sinalização: trímero transmembranar (mbTNF), que se liga a outras células numa sinalização parácrina clássica e um trímero solúvel (sTNF), que é resultado de uma clivagem realizada pela enzima conversora de TNF- α (TACE ou ADAM17). Dessa forma, com a ação da enzima TACE, o mbTNF é convertido a TNF solúvel (sTNF), que é a forma circulante com capacidade endócrina de agir em locais distantes (BLACK *et al.*, 1996; MOSS *et al.*, 1997; SEDGER; MCDERMOTT, 2014).

O sTNF e o mbTNF se ligam aos seus receptores transmembranares, os receptores de fator de necrose tumoral do tipo 1 (TNFR1/TNFRSF1/CD120A ou p55) e do tipo 2 (TNFR2/TNFRSF1B/CD120B ou p75), onde o mTNF é um ligante mais potente para TNFR2, e o sTNF pelo TNFR1 (Figura 7).

O TNFR1 é encontrado constitutivamente na maioria das células, porém o TNFR2 tem expressão muito mais restrita à células imunes, como Monócitos, Linfócitos T_{reg} (levando a uma estimulação dessa subpopulação de células) além de células endoteliais e neurônios (CARPENTIER; COORNAERT; BEYAERT, 2004), mas ambos podem se interagir na célula, pelo fenômeno conhecido como “passagem de ligante” regulando a associação de TNF com o TNFR1. Esses receptores também são clivados pela TACE e se tornam receptores solúveis do tipo 1 e 2 (sTNFR 1 e sTNFR2) considerados potentes inibidores naturais de TNF- α , uma

vez que são capazes de competir pelo sítio de ligação do TNF- α , modulando sua bioatividade (ADERKA et al., 1992; VAN ZEE et al., 1992; MOHAMED-ALI et al., 1999).

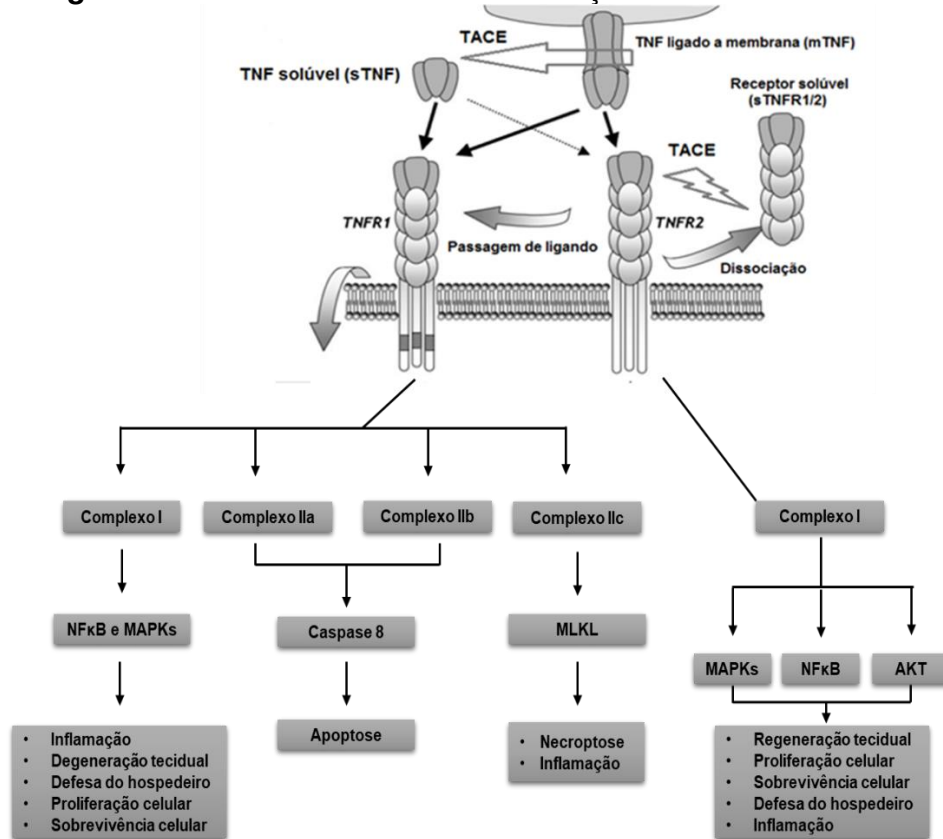
O TNFR1 contém um domínio de morte em sua constituição e por isso quando ligado ao TNF induz ativação de fator nuclear (NFKB) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) que leva a morte celular por apoptose, necroptose e piroptose, este processo promove e exacerba a inflamação. (ANDERTON et al., 2020).

É importante destacar que a morte celular não é uma resposta padrão das células ao TNF, e que o processo de morte ocorre quando algum ponto na via intracelular é inativado. Vários eventos moleculares e de transdução de sinais acontecem depois que ocorre a interação do ligante com os receptores, esses eventos são importantes para o TNF- α desempenhar todas suas funções. Após ativação via TNFR1, o complexo I é formado (ligado a membrana da célula) levando a ativação da MAPK e de NFKB, bem como do fator 2 associado ao TNFR (TRAF2) que culmina com a expressão aumentada de genes pró-inflamatórios. Quando o complexo I é dissociado da membrana e associado a proteína contendo o domínio de morte (FADD) e a caspase 8 forma-se então um complexo potencialmente citotóxico, o complexo II. ANDERTON et al., 2020).

Existem três mecanismos que reprimem a atividade citotóxica promovida pelo complexo II. O inibidor do fator nuclease KB quinase (IKK) que atua inibindo a atividade da proteína quinase 1 (RIPK1). O segundo mecanismo é a regulação positiva, dependente de NFKB, de genes pró-sobrevivência, como o gene que codifica a proteína inibidora do tipo FLICE (FLIP). O terceiro mecanismo consiste na clivagem da RIPK1 pela caspase 8, dessa forma inibindo-a.

Ao contrário, o TNFR2 não tem domínio de morte, mas pode induzir indiretamente a morte celular via TNFR1, pela passagem do ligante em que o TNF- α se liga ao TNFR1 (TARTAGLIA et al., 1993a, 1993b). Este receptor forma um complexo intracelular com o fator associado ao receptor de TNF (TRAF) (REDDY et al., 2000). Como não tem domínio de morte, o TNFR2 pode recrutar o TRAF para ativar NFKB e MAPK. Este receptor está mais associado com efeitos homeostático como sobrevivência celular e regeneração de tecidos. Em camundongos deficientes de TNFR2 a capacidade proliferativa de células CD4⁺ e CD8⁺ foi prejudicada levando a diminuição da produção de citocinas inflamatórias (KIM et al., 2006; 2008).

Figura 7. Processo de síntese e interação do TNF com TNFR.



Fonte: Adaptado de MacEwan, (2002) e Kalliolias; Ivashkiv, (2015). Nota: TACE: Enzima Conversora de TNF- α . NF κ B: Fator nuclear κ B. MAPKs: Proteína quinase ativada por mitógeno. MLKL: Domínio de quinase de linhagem mista. AKT: Proteína quinase B.

Diversas doenças estão associadas ao TNFR1 e TNFR2 incluindo distúrbios metabólicos como diabetes mellitus do tipo 2. O TNFR1 induz a resistência à insulina mediada pela ligação ao TNF- α , pois o TNF- α age nos receptores de insulina (SALTIEL, 2001). Além disso, foi demonstrada uma correlação entre os receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) e distúrbios cardiovasculares associados com rigidez arterial podendo contribuir diretamente para arteriosclerose e insuficiência cardíaca (KIM *et al.*, 2016; SAFRANOW *et al.*, 2009). Por outro lado, a inibição do TNFR1 leva a atenuação da disfunção ventricular, entretanto a inibição do TNFR2 exacerba essa disfunção em camundongos (MONDEN *et al.*, 2007). Em estudos experimentais, a trombose arteriolar foi mais pronunciada em camundongos deficientes de TNFR1 (TNFR1^{-/-}) (PIRCHER *et al.*, 2012).

2.6 Inibidores de TNF

O uso do TNF como agente quimioterápico apresenta grande limitação pela alta toxicidade. No entanto, o bloqueio desta citocina, com anticorpos monoclonais (mABs), em muitas doenças inflamatórias, entrou em grande evidência devido a meia-vida longa e segurança apresentada *in vivo*. Desde sua descoberta e aplicações, ainda na década de 90, os agentes anti-TNF estão entre uma das maiores descobertas da medicina moderna.

Infliximabe (anti IgG quimérico – Remicade®), Golimumabe (mAB totalmente humano - Simponi®), Certolizumabe (Cimzia®), Etanercepte (fusão entre TNFR2 com a porção Fc da IgG1 – Enbrel®) e Adalimumabe (mAB totalmente humano - Humira®) são aprovados em ensaios clínicos e utilizados em diversas patologias que tem o TNF como agente chave (LETHABY et al., 2013).

Em 1998, o Etanercepte que é uma fusão do TNFR2 com o domínio do fragmento cristalizável (Fc) de IgG1 humano, foi o primeiro receptor recombinante aprovado para uso em humanos com ligação ao TNF comparável à ligação do TNFR2 e dessa forma impedindo a toxicidade e consequentemente a inflamação provocada pelo TNF (LETHABY et al., 2013).

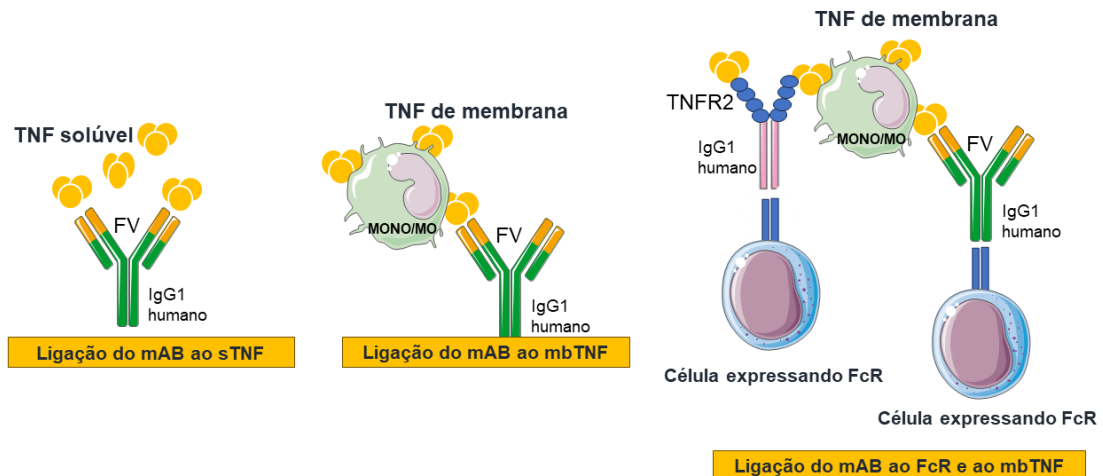
Esses agentes são anticorpos de camundongos, quiméricos ou totalmente humanos e fusão entre a porção Fc com o sTNFR2 humano. O Adalimumabe é uma IgG1 totalmente humana que neutraliza o TNF e teve sua avaliação realizada em 2002 com grande sucesso, pois ainda na fase clínica I, demonstrou segurança, ótima distribuição, absorção e metabolismo além de eficácia na artrite reumatóide (AR) (BROEDER et al., 2002; WEINBLATT et al., 2003).

De maneira geral, esses agentes anti-TNF ligam-se ao sTNF e mbTNF com alta afinidade, impedindo que o TNF se ligue aos TNFR, e desta forma prejudicando a ativação dessa via, o que impede toda a capacidade que esta citocina tem quando ligada a seus receptores (ROBERTS et al., 2011; SEDGER; McDERMOTT, 2014). Ainda, o Etanercepte além de ligar ao sTNF também se liga a Linfotóxina α (LT- α), o que é um diferencial com relação às outras terapias anti-TNF.

O mecanismo de ligação desses agentes ao mbTNF leva a capacidade de indução de uma sinalização reversa, ou seja, a droga anti-TNF se liga ao mbTNF em células que expressam essa forma. Além disso, naquelas células que expressam receptores IgG Fc (FcR), principalmente da linhagem mieloide, e nas drogas que tem

a porção Ig essa ligação envolve a citotoxicidade mediada por anticorpo (ADCC) (KIRCHNER et al., 2004; MITOMA et al., 2005).

Figura 8. Mecanismo de ação dos anti-TNF



Fonte: Adaptado de SEDGER; MCDERMOTT, 2014

Assim, a nível de sistema imunológico a terapia com essas drogas culmina com a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, reduz inflamação por impactar na migração de células inflamatórias para os tecidos além do aumento de células T reguladoras (EVANGELATOS et al., 2022).

Destaca-se ainda que devido à alta complexidade dos biológicos anti-TNF, seus mecanismos não são completamente compreendidos uma vez que alguns agentes têm sua eficácia mais restrita a algumas doenças inflamatórias do que outros, como o Etanercepte que não tem quase nenhuma eficácia na doença de Crohn quando comparado ao Infliximabe, um agente anti-TNF quimérico, muito eficaz na doença de Crohn e artrite reumatoide (RUTGEERTS et al., 1999; SEDGER; McDERMOTT, 2014).

Alguns estudos relatam que o Infliximabe induz uma maior expressão de IL-10 (durante o processo de sinalização reversa), mas o Etanercepte é resultado da fusão com o TNFR2 que é um importante agonista, e que também faria sinalização reversa. Portanto é claro a busca por mais estudos que avaliem essa dinâmica (SEDGER; McDERMOTT, 2014).

É importante destacar que há um espectro de efeitos adversos dessas drogas como reações nos locais de aplicação, desenvolvimento de anticorpos contra esses agentes anti-TNF, reativação de doenças infecciosas como tuberculose ou infecções virais latentes (SEDGER; McDERMOTT, 2014).

As pesquisas envolvendo pacientes com doenças cardíacas devem ser estimuladas, os estudos que avaliam a segurança do uso dos bloqueadores nessa população de pacientes são controversos, enquanto Infliximabe numa concentração de 10mg/Kg foi relacionado a uma piora da insuficiência cardíaca em humanos tratados em outro estudo esses efeitos foram mínimos ou ausentes (STOEP et al., 2013)

Quadro 1. Lista de terapias anti-TNF disponíveis e sua indicação

Nome Estrutura do medicamento	Marca (Empresa e data de aprovação)	Via (Meia-Vida/Co-terapia)	Indicações
Etanercepte Proteína de fusão recombinante: TNFR2 humano: IgG1-Fc	Enbrel® (Immunex/now Amgen (US), e Pfizer (UK)) Registrado em Nov.1998	Injeção S.C 2-4 semanas 25mg	Artrite reumatoide Artrite idiopática juvenil poliarticular Artrite psoriática Espondilite anquilosante Psoríase em placas
Infliximabe Humanizado (quimérico) IgG1k mAB	Remicade® (Centocor Ortho Biotech Inc. (US) e Janssen-Cilag Pty Ltd. (UK)) Registrado em Ago.1998	Infusão I.V 4 semanas 100 mg	Artrite reumatoide Artrite psoriática Espondilite anquilosante Psoríase em placas Doença de Crohn (M/G)
Adalimumabe IgG1 humano k mAB	Humira® (ABBVIE Inc.) Registrado em Dez. 2002	Injeção S.C 2-4 semanas 40mg/0.8mL	Artrite reumatoide Artrite psoriática Psoríase em placas Espondilite anquilosante Doença de Crohn (M/G) Artrite idiopática juvenil (G)
Golimumabe IgG1 humano k mAB	Simponi® (Centocor Ortho Biotech Inc) Registrado em Abr 2009	Injeção S.C 2 semanas 50mg	Colite ulcerativa Artrite reumatoide Artrite psoriática Psoríase em placas

Certolizumab Pegol IgG1 k mAB	Cimzia® (UCB Pharma SA) Registrado em Abr 2008	Injeção S.C 200mg	Artrite reumatoide Artrite psoriática Espondilite anquilosante Doença de Crohn (M/G)
---	---	----------------------	---

Fonte: SEDGER; McDERMOTT, 2014

2.7 Receptores de TNF na infecção pelo *T. cruzi*

A ativação do TNFR1 parece ser extremamente importante durante a infecção experimental aguda. Camundongos deficientes em TNFR1 e infectados com *T. cruzi* são mais suscetíveis e apresentam alta taxa de parasitemia e sobrevida menor quando comparado aos controles. Essa susceptibilidade pode estar relacionada a maturação defeituosa de células B com consequente diminuição de imunoglobulina G (ALIBERTI et al., 2001; CASTAÑOS-VELEZ et al., 1998; KROLL-PALHARES et al., 2008; PÉREZ et al., 2007, 2017; VILLAR et al., 2013).

O TNFR2 tem menos influência no controle de parasitas durante a fase aguda, pois camundongos deficientes em TNFR2 apresentaram níveis semelhantes de parasitas circulantes quando comparado aos camundongos do grupo controle (sem deficiência) (ALIBERTI et al., 2001; VILLAR et al., 2013). Pérez et al. (2007) infectaram camundongos duplo e único *knockout* em TNFR1/2 e esses animais apresentaram alta parasitemia, mas provavelmente relacionada à deficiência do TNFR1. Animais deficientes em TNFR2 apresentaram aumento da parasitemia, porém foram mais resistentes à morte (PÉREZ et al., 2007).

Além do controle parasitário, TNFR1 parece estar envolvido no recrutamento celular e inflamação, pois camundongos deficientes neste receptor de TNF apresentaram ausência de infiltrado inflamatório no miocárdio quando comparado aos animais do grupo controle que apresentaram lesões graves (PÉREZ et al., 2007).

Durante a infecção aguda, ambos os receptores solúveis sTNFR1/2 se elevam, mas o sTNFR2 se eleva mais rápido e em quantidades maiores se estabilizando durante a fase crônica (TRUYENS et al., 1999). Ainda a relação TNF/sTNFR quando mais diminuída mais refletia piora nos camundongos, comprovado por caquexia e alta parasitemia. O desequilíbrio endógeno entre receptores solúveis reflete o desfecho clínico de camundongos durante a fase aguda, onde análises em camundongos antes da morte indicaram que houve uma

relação TNF/sTNFR prejudicada, quando comparada ao grupo controle (TRUYENS *et al.*, 1999).

No estudo de Bilate *et al.* (2007) foi demonstrado que a ausência da sinalização do TNF (pela inibição com Etanercepte) e a infecção são importantes fatores aceleradores da insuficiência cardíaca, uma vez que a função ventricular e %FEVE foram diminuídas após o tratamento com inibidor de TNF, o Etanercepte (proteína de fusão composta pelo sTNFR2 mais a região Fc da IgG), em *hamsters* infectados. O bloqueio do TNF levou a uma distribuição anormal do infiltrado inflamatório, onde as células se restringiram a região subendocárdica. Essa anormalidade pode ser explicada pela relação do TNF com quimiocinas, uma vez que TNF- α tem papel no aumento da expressão de quimiocinas MCP-1 e MCP-1 α e moléculas de adesão que leva a uma infiltração aumentada de leucócitos no miocárdio (BILATE *et al.*, 2007).

De acordo com Bilate *et al.* (2007) esses achados impossibilitam o uso desse bloqueador em humanos com cardiopatia chagásica crônica pelo agravamento dessa condição. Porém novos estudos utilizando esse bloqueador em outros animais, com doses diferentes ou em associação podem trazer novas perspectivas.

Em contrapartida ao uso do Etanercepte, a terapia com Infliximabe (anticorpo monoclonal IgG1 quimérico) mostrou ser promissora no tratamento de camundongos infectados cronicamente. O bloqueio do TNF além de não reativar a infecção, levou a uma diminuição das células T e macrófagos no coração, além do impacto na diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento (PÉREZ *et al.*, 2009) ou manutenção (PEREIRA *et al.*, 2014) de IL-10. A terapia com Infliximabe restaurou a frequência cardíaca normal pelos dados do eletrocardiograma. Também reduziu a proporção de animais afetados por arritmias e bloqueio átrio ventricular (PEREIRA *et al.*, 2014).

Pereira *et al.* (2014) viram que houve diminuição de TNFR1 em células T após o tratamento com Infliximabe. O bloqueio interrompeu a retroalimentação positiva da sinalização TNF/TNFR1, e dessa forma levou a diminuição da ativação celular induzida pelo TNF. Com esses achados a curto e longo prazo, a terapia utilizando Infliximabe traz novas perspectivas no tratamento da doença de Chagas crônica, mas deve-se ter investigações mais detalhadas, como a reativação de outras infecções (PÉREZ *et al.*, 2009).

Poucos estudos abordam a expressão do TNFR em portadores da doença de Chagas crônica. Mocelin *et al.* (2005) não encontraram diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de sTNFR1 entre os grupos, além de nenhuma associação com eventos clínicos, como sobrevida e transplante cardíaco. De acordo com os autores, o pequeno número de pacientes (28) e o período limitado de análise foram lacunas para o estudo (MOCELIN *et al.*, 2005). Em outro estudo, níveis circulantes de sTNFR2 foram 60% maiores em neonatos infectados quando comparado aos não infectados e permaneceram elevados com 1 ano de idade. Podendo ser útil na orientação da presença de transmissão vertical durante a infecção (GARCÍA *et al.*, 2008).

Receptores solúveis, sTNFR1 e sTNFR2, encontram-se elevados no soro de 133 pacientes com doença de Chagas quando comparado aos não infectados. Apesar de não haver diferença estatística entre os portadores crônicos, os níveis de sTNFR1 se elevam à medida que ocorre o agravamento da doença. Além disso, foi verificado uma correlação negativa entre sTNFR1 e TNF em portadores da forma IND, sugerindo que essa relação pode impedir a progressão para formas mais graves, como a forma cardíaca. Os autores sugerem a importância no balanço endógeno dos receptores solúveis de TNF, e indicam proteção e equilíbrio nos pacientes com doença de Chagas crônica (TORRES *et al.*, 2022).

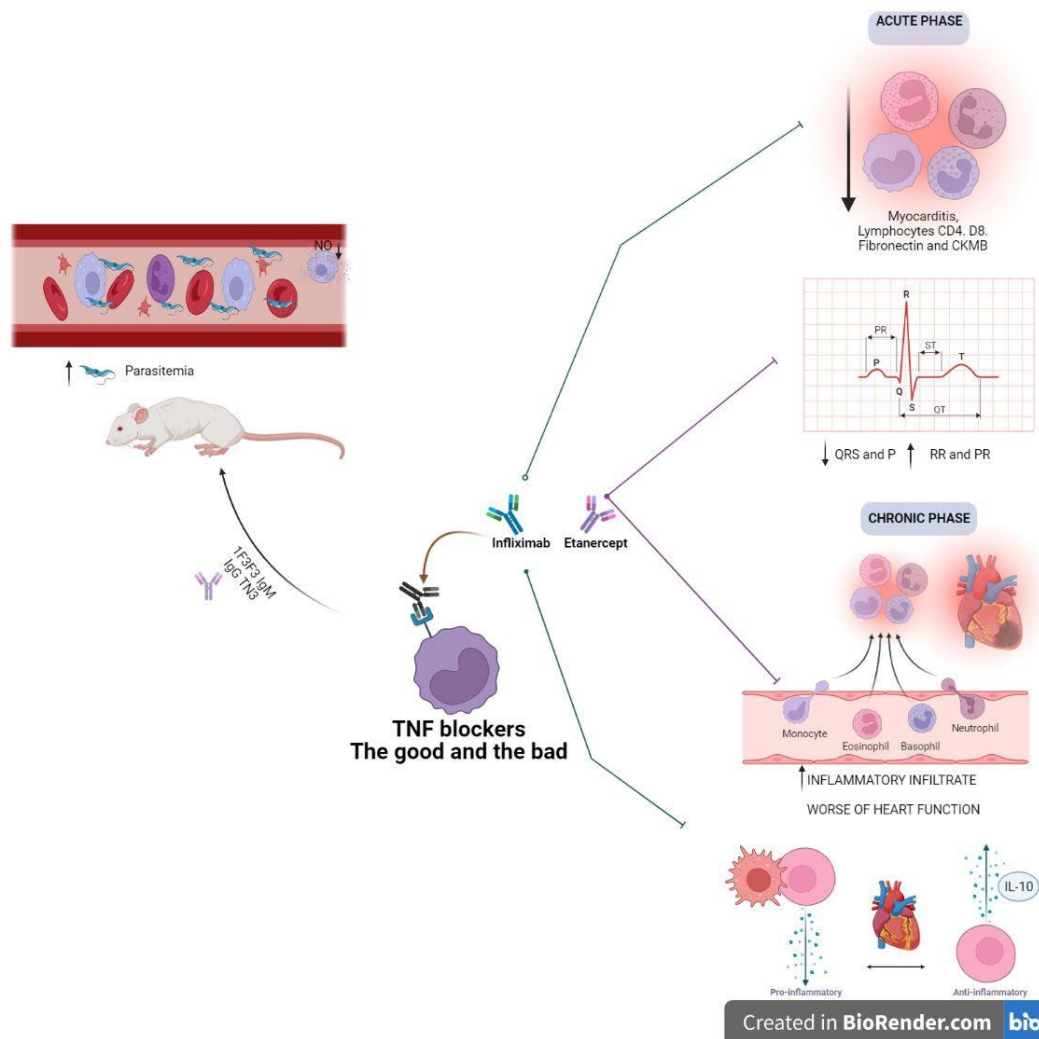
Mecanismos apoptóticos via TNF/TNFR em linfócitos e neutrófilos desencadeados pelo *T. cruzi* podem contribuir tanto na patogênese cardíaca quanto em mecanismos de escape do parasita, respectivamente (CHAVES *et al.*, 2016; MAGALHÃES *et al.*, 2017). Linfócitos de pacientes com CCC apresentam maior frequência de células apoptóticas quando comparado com a forma IND e não infectados. Uma correlação positiva e significativa dessas células expressando TNF- α também foi vista. Os resultados mostraram que a superfamília de receptores de morte celular (FADD, TRADD, TNFRSF10A (receptor de TNF membro da superfamília 10A), TNFRSF10B, TNFRSF11B, TNFRSF21 e TNFRSF25) foram regulados positivamente quando comparados com o grupo IND, mesmo sem estímulo *in vitro* (com antígenos solúveis de *T. cruzi*). Após estímulo, a expressão dessas moléculas aumentou consideravelmente (CHAVES *et al.*, 2016).

Neutrófilos de humanos infectados *in vitro* com a cepa *Colombiana* e *Y* revelaram ter baixa viabilidade devido à alta taxa de apoptose quando comparado aos monócitos. TNFR2 foi altamente expresso nos neutrófilos após estímulo e

responsável pela apoptose juntamente com Fas ligante (FasL) (MAGALHÃES *et al.*, 2017). A morte apenas em neutrófilos foi atribuída a uma estratégia de escape do *T. cruzi* e que esse receptor tem importância durante a fase inicial da infecção em humanos. Níveis de TNFR2 foi maior em células de sangue periférico de portadores com a forma indeterminada e cardíaca quando comparada aos não infectados. Apesar de TNFR1 se elevar em PBMC dos portadores, os autores não encontraram nenhuma diferença estatística (GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Apesar dos avanços sobre os mecanismos de atuação e regulação dos receptores de TNF- α , ainda não está totalmente elucidado o papel dessas moléculas na imunopatogênese da doença de Chagas humana, portanto entender como esses receptores se comportam em células circulantes de portadores de diferentes formas clínicas da doença podem auxiliar no quebra cabeça não resolvido da resposta imune na doença de Chagas (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ *et al.*, 2018).

Figura 9. Efeitos do bloqueio de TNF na infecção pelo *T. cruzi*



Fonte: O autor

3 JUSTIFICATIVA

Vários são os mecanismos relacionados ao parasita e ao hospedeiro na forma crônica da doença que permanecem não elucidados, dentre eles os mecanismos imunológicos envolvidos na evolução da forma clínica indeterminada para a forma cardíaca. Já foi demonstrado em vários estudos que a citocina TNF desempenha um papel importante na patogênese da doença. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que essa citocina se eleva e está diretamente relacionada ao dano cardíaco, sendo uma citocina chave na resposta imune contra o *T. cruzi* e doença de Chagas (FERREIRA *et al.*, 2013; LANNES-VIEIRA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Mas, para o TNF desempenhar suas funções *in vivo* é necessária a ligação a receptores presente na membrana de células, essa interação (TNF/TNFR) medeia à resistência do hospedeiro a vários agentes infecciosos levando a atividades microbicidas de fagócitos além do impacto na indução de apoptose, crescimento e diferenciação celular (CASTANOS-VELEZ *et al.*, 1998). Considerados potentes inibidores da atividade da citocina e dessa forma impedem suas ações pró-inflamatórias, os receptores solúveis de TNF (sTNFR1/2) se elevam em muitas condições inflamatórias.

Avaliar os receptores de TNF em diferentes células participantes da resposta imune na doença de Chagas, poderia levar a um entendimento mais preciso do papel relevante em mecanismos que auxiliam ou inibem atividades deletérias do TNF, contribuindo para o melhor entendimento da imunopatogênese na doença. E dessa forma ainda poderiam tornar-se biomarcadores imunológicos de gravidade e/ou prognóstico.

Sendo assim, esperamos entender a atuação do TNF e de seus receptores em células provenientes de portadores das formas clínicas IND e CARD (com graus distintos de manifestações cardíaca). Além disso, o impacto que a ausência da sinalização, a partir da inibição desta citocina, com drogas anti-TNF, nas demais citocinas do perfil pró inflamatório e anti-inflamatório.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a os níveis de TNF e expressão dos seus receptores em portadores de cardiomiopatia chagásica crônica.

4.2 Objetivos específicos

- a) Identificar a frequência dos receptores TNFR1 e TNFR2 em linfócitos T CD4+, TCD8+ e T regulatórios em portadores das formas clínicas crônicas IND e CARD;
- b) Identificar a frequência dos receptores TNFR1 e TNFR2 em monócitos totais e suas subpopulações além de células CD16+ em portadores das formas clínicas crônicas IND e CARD;
- c) Detectar a frequência intracelular das citocinas TNF e IL-10 em subpopulações de monócitos e linfócitos de portadores das formas clínicas crônicas IND e CARD;
- d) Correlacionar a expressão de TNFR1 e TNFR2 nas diferentes populações celulares com os graus de gravidade da cardiomiopatia chagásica através da %FEVE;
- e) Correlacionar a expressão de TNFR1 e TNFR2 com TNF nas diferentes populações celulares provenientes de portadores com formas clínicas crônicas IND e CARD;
- f) Correlacionar a expressão de TNFR1 com TNFR2 nas diferentes populações celulares provenientes de portadores com formas clínicas crônicas IND e CARD;
- g) Avaliar a expressão das citocinas TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-2 e IL-10 provenientes de células de sangue periférico de portadores com as formas clínicas IND e CARD submetidas ao tratamento com dois bloqueadores de TNF, Adalimumabe e Etanercepte isolados ou associados ao Benzonidazol.
- h) Correlacionar as citocinas provenientes das condições de cultura com a %FEVE

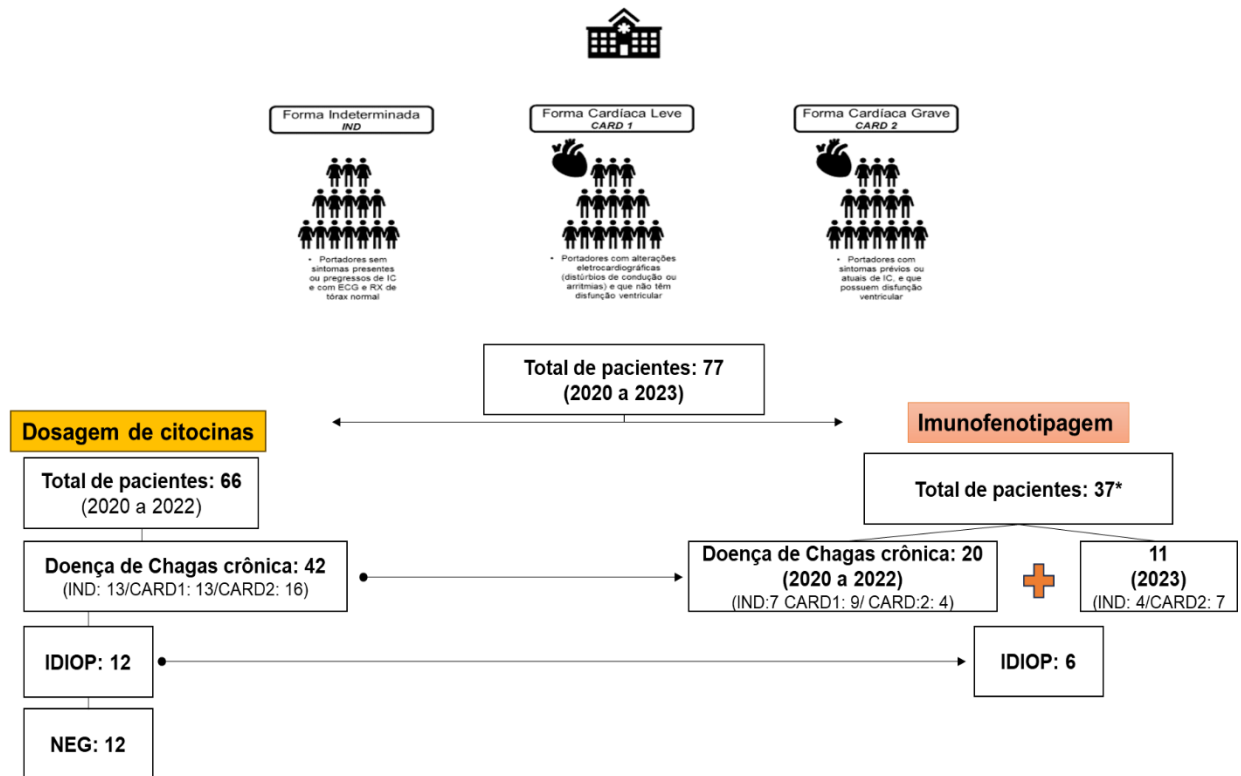
5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 População de estudo

Foram selecionados 77 pacientes ao total, destes, 53 eram portadores crônicos da doença de Chagas que foram atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), da Universidade de Pernambuco (UPE) no período de 2020 a 2023. Atualmente, o ambulatório, Casa de Chagas, 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 Ministério da Saúde (DIAS et al., 2016) e não ter sido submetido ao tratamento etiológico ou que tenham recebido o tratamento há pelo menos 3-5 anos da data da coleta. Os pacientes foram excluídos do estudo quando: apresentavam queixas digestivas compatíveis com a forma digestiva da doença de Chagas, submetidos ao tratamento etiológico recente a coleta, possuíam alguma co-infecção de origem infecciosa ou parasitária, faziam uso de dispositivo implantável como o marcapasso e distúrbios de origem neoplásica ou endócrina.

A classificação clínica foi realizada por médicos cardiologistas seguindo o II Consenso em Doença de Chagas (DIAS et al., 2016) e a classificação da cardiopatia foi realizada através da I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (Andrade et al., 2011). Os grupos foram divididos em 3 (Figura 7):

1. Indivíduos portadores da forma indeterminada (Grupo IND) (n=17), sem sintomas cardíacos e com ECG e ECO normais;
2. Indivíduos portadores da forma cardíaca leve (Grupo CARD 1) (n=13), 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);
3. Indivíduos portadores da forma cardíaca grave (Grupo CARD 2) (n=23) com disfunção ventricular e sintomas atuais ou anteriores de ICC.

Figura 10. Seleção dos pacientes

Fonte: O autor. Nota: *37 para imunofenotipagem, sendo 20 coletados de 2020 a 2022 e 11 coletados em 2023. As setas indicam que as amostras dos mesmos pacientes foram utilizadas em dois experimentos distintos. Das 42, 20 amostras foram utilizadas para os ensaios de imunofenotipagem. E do grupo IDIOP, das 12, 6 amostras foram utilizadas para os ensaios de imunofenotipagem.

Os valores do percentual da fração de ejeção ventricular esquerda (%FEVE) foram adquiridos através da realização do ecocardiograma. A FEVE é considerada o parâmetro mais importante na avaliação da função sistólica e o melhor indicador prognóstico de sobrevida em pacientes cardíacos. Os grupos controles foram divididos em dois: não infectados (NEG) constituído por 12 indivíduos, onde não poderiam ter habitado em área endêmica para a doença de Chagas; nunca ter recebido transfusão de sangue e ter apresentado teste sorológico não reagente. E um grupo constituído por portadores de cardiopatia não chagásica, sem definição da causa de base, sendo, portanto, classificados como portadores de cardiopatia idiopática (IDIOP) (n=12). É importante salientar que este último grupo apresenta percentual de Fração de Ejeção Ventricular Esquerdo -%FEVE, semelhante aos pacientes do grupo CARD2 (Tabela 1).

Tabela 1: Características clínicas e epidemiológicas da população de estudo

Variáveis	NEG	IDIOP	IND	CARD 1	CARD 2
Número de pacientes	12	12	17	13	23
Idade (anos)	52 ± 7.37	56.4 ± 10.32	53 ± 13.7	57 ± 12.83	58.7 ± 13.08
Sexo					
Masculino	2 (16.66%)	7(58.33%)	3 (23.08%)	3 (23.08%)	9 (56.25%)
Feminino	10 (83,34%)	5 (41.66%)	10 (76.92%)	10 (76.92%)	7 (43.75%)
Altura (Metros)	-	1.65 ± 0.9	1.60 ± 0.09	1.57 ± 0.10	1.61 ± 0.08
Peso (Kg)	-	71±13.9	75.23±13.4	66.3±9.59	69.8±16.9
IMC (kg/m²)	-	26.24±5.92	29.4±4.30	27.04±3.87	26.67±5.76
Região (Pernambuco)					
Sertão	1 (8.33%)	-	3 (23.07%)	4 (30.76%)	1 (6.25%)
Agreste	-	1 (8.33%)	3 (23.07%)	2 (15.38%)	2 (12.5%)
Mata	-	4(33.33%)	2 (15.38%)	3 (23.07%)	5 (31.25%)
Metropolitana	11 (91.6%)	7(58.33%)	5 (38.46%)	3 (23.07%)	8 (50%)
Outros estados	-	-	-	1 (7.69%)	-
Ecocardiograma					
FEVE (%)	-	38.35 ± 16.13	64.7 ± 4.8	64.2 ± 4.23	33.44 ± 9.87

Resultados apresentados como frequência, média e interquartil. **, P < 0,0001, CARD 2 vs IND (teste de Mann-Whitney).

5.2 Coleta de Sangue

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

5.3 Confirmação da sorologia para a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizados dois testes imunoenzimáticos para a confirmação da infecção chagásica com registro ativo na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo um deles o Elisa convencional, kit comercial Test Elisa Chagas III (Biochile, Grupo Bio, Santiago, Chile). A microplaca é sensibilizada com lisado total

das cepas de *T. cruzi* Tulahuén e Mn, incluindo antígenos de membrana altamente imunogênicos. E o outro, denominado Elisa recombinante, kit comercial Imuno-Elisa Wama (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil), que utiliza antígenos recombinantes purificados. A metodologia foi realizada conforme orientações dos fabricantes. Os resultados foram interpretados como reagentes quando ambos os testes apresentarem reatividade, e não-reagentes quando ambos não apresentarem reatividade (DIAS et al., 2016). Amostras que se mantiverem discordantes mesmo após repetição dos testes foram interpretadas como inconclusivas, sendo excluídas da pesquisa.

5.4 Obtenção 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 (1 parte de Ficoll-Paque e 3 da mistura sangue-PBS). 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. Em seguida as PBMC's foram contadas em câmara de Neubauer através do corante de vitalidade Azul de Trypan (1:10) e ajustadas para a concentração de 1×10^6 células.

5.5 Imunofenotipagem

As células foram incubadas em tubos de cultura de 15mL de polipropileno (BD Falcon) com adição de 1 µL de Brefeldina A (GolgiPlug™, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂ para assegurar a retenção das citocinas no interior celular para marcação intracitoplasmática. Após o período de incubação, as células foram tratadas com 110 µL de EDTA (20 mM) por 15min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 2 mL de PBS-Wash gelado. Os tubos foram então centrifugados a 400xg por 5 min à temperatura ambiente. Os anticorpos de superfície foram devidamente adicionados em volumes previamente titulados. Após incubação de 30min ao abrigo da luz, as células foram permeabilizadas (Solução Perm-Wash, BD Biosciences), e incubadas com os

anticorpos intracitoplasmáticos por 30 minutos e após lavagens com tampão PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% (PBS-Wash), as células foram fixadas (Cytofix - BD Biosciences). Após estes procedimentos as células foram então estocadas a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo FACS Aria III (Beckton Dickson) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As análises foram realizadas através do *Software* FlowJo versão 10 (Beckton Dickson). O Quadro 1 apresenta os anticorpos que foram utilizados para a avaliação da marcação com anticorpos de superfície e intracitoplasmáticos.

Quadro 2- Características dos anticorpos utilizados nos ensaios para avaliação dos receptores de TNF (CD120A e CD120B) em linfócitos T CD4, CD8, T regulatórios e monócitos

Anticorpo	Clone	Isotipo	Fluorocromo	Volume (µL)
SUPERFÍCIE				
CD14	TuK4	Mouse / IgG2a	FITC	2.5
CD16	3G8	Mouse / IgG1, kappa	PerCP	2.5
CD4	S3.5	Mouse IgG2a	PerCP	2
CD8	MEM-31	Mouse IgG2a	FITC	2
CD127	HIL-7R-M21	Mouse IgG1, kappa	BV510	4
CD120A	16803	Mouse IgG1	APC	2
CD120B	hTNFR-M1	Rat IgG _{2b} , kappa	PE	4
	MR2-1	Mouse IgG ₁		5
INTRACELULAR				
TNF	MAb11	Mouse IgG ₁ , kappa	PECy7	2.5
IL-10	JES3-9D7	Rat IgG ₁	BV421	5
FOXP3	259D/C7	Mouse BALB/c, IgG ₁	CF594	4

Legenda: CD: *Cluster of differentiation*; APC: Alociocianina; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCP: *Peridinin chlorophyll protein complex*

5.5.1 Aquisição e estratégia de análise

As células foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSaria III (Beckton Dickson) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Para linfócitos T foram lidos um total de 100.000 eventos e aproximadamente 50.000 eventos para monócitos. As populações celulares e marcações de superfície e intracitoplasmáticas estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3. Caracterização das subpopulações de células

TIPO CELULAR	MARCAÇÃO SUPERFÍCIE	MARCAÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA
Linfócitos T		
T CD4	CD4+CD120A+ CD4+CD120B+	CD4+CD120A+TNF+/IL-10+ CD4+CD120B+TNF+/IL-10+
T CD8	CD8+ CD120A+ CD8+CD120B+	CD8+CD120A+TNF+/IL-10+ CD8+CD120B+TNF+/IL-10+
T reg	CD4+FOXP3+CD127-CD120A+ CD4+FOXP3+CD127-CD120B+	CD4+FOXP3+CD127-CD120A+TNF+/IL-10+ CD4+FOXP3+CD127-CD120B+TNF+/IL-10+
Monócitos totais		
CD14	CD14+CD120A+ CD14+CD120B+	CD14+CD120A+TNF+/IL-10+ CD14+CD120B+TNF+/IL-10+
Células CD16+		
CD16	CD16+ CD120A+ CD16+CD120B+	CD16+CD120A+TNF+/IL-10+ CD16+CD120B+TNF+/IL-10+
Subpopulações de monócitos		
Clássicos	CD14++CD16-CD120A+ CD14++CD16-CD120B+	CD14++CD16-CD120A+ TNF+/IL-10+ CD14++CD16-CD120B+ TNF+/IL-10+

Intermediários	CD14++CD16+CD120A+ CD14++CD16+CD120B+	CD14++CD16+CD120A+TNF+/IL-10+ CD14++CD16+CD120B+TNF+/IL-10+
Não clássicos	CD14+CD16++CD120A+ CD14+CD16++CD120B+	CD14+CD16++CD120A+TNF+/IL-10+ CD14+CD16++CD120B+TNF+/IL-10+

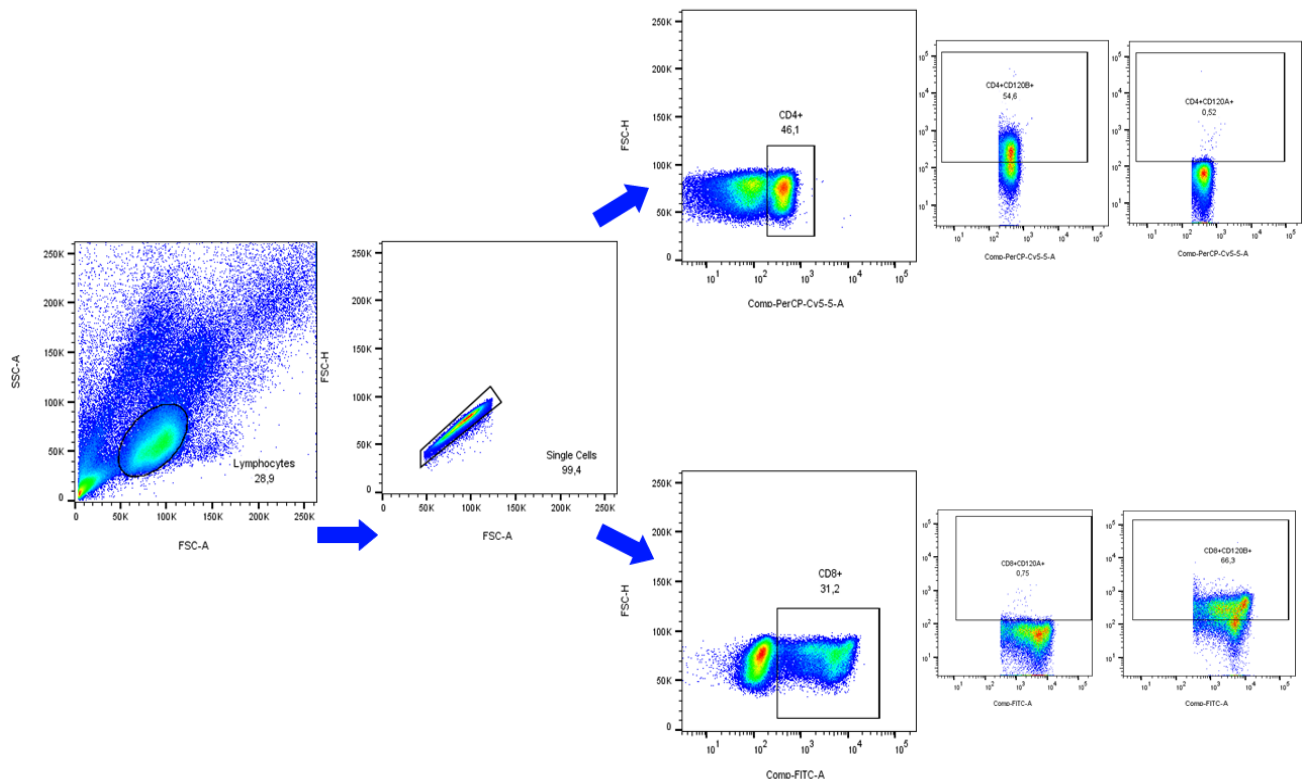
Fonte: O autor

No *FlowJo*, a estratégia de gate seguiu diferentes delimitações de acordo com a análise das diferentes populações celulares (Linfócitos TCD4, TCD8, Treg e Monócitos). Mas, inicialmente as populações foram delimitadas pelo gráfico *dot plot* que avalia o tamanho celular, pela dispersão frontal (*forward scatter*, FSC) *versus* granulosidade, pela dispersão lateral (*Side Scatter*, SSC).

Em seguida, a região selecionada foi delimitada para seleção de células únicas (*Single cells*) para diminuir a população de *debris* celulares. Após a seleção das células únicas foram construídos gráficos de fluorescência, ou seja, células devidamente marcadas e positivas para os diferentes marcadores utilizados (Ex: FSC-H vs anti-CD4-PercP).

Esses gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência para as diferentes populações, ou seja, que permitiram a avaliação das fluorescências e positividade dos diferentes anticorpos sempre foram comparadas com tubos sem marcação, ou seja, sem qualquer anticorpo.

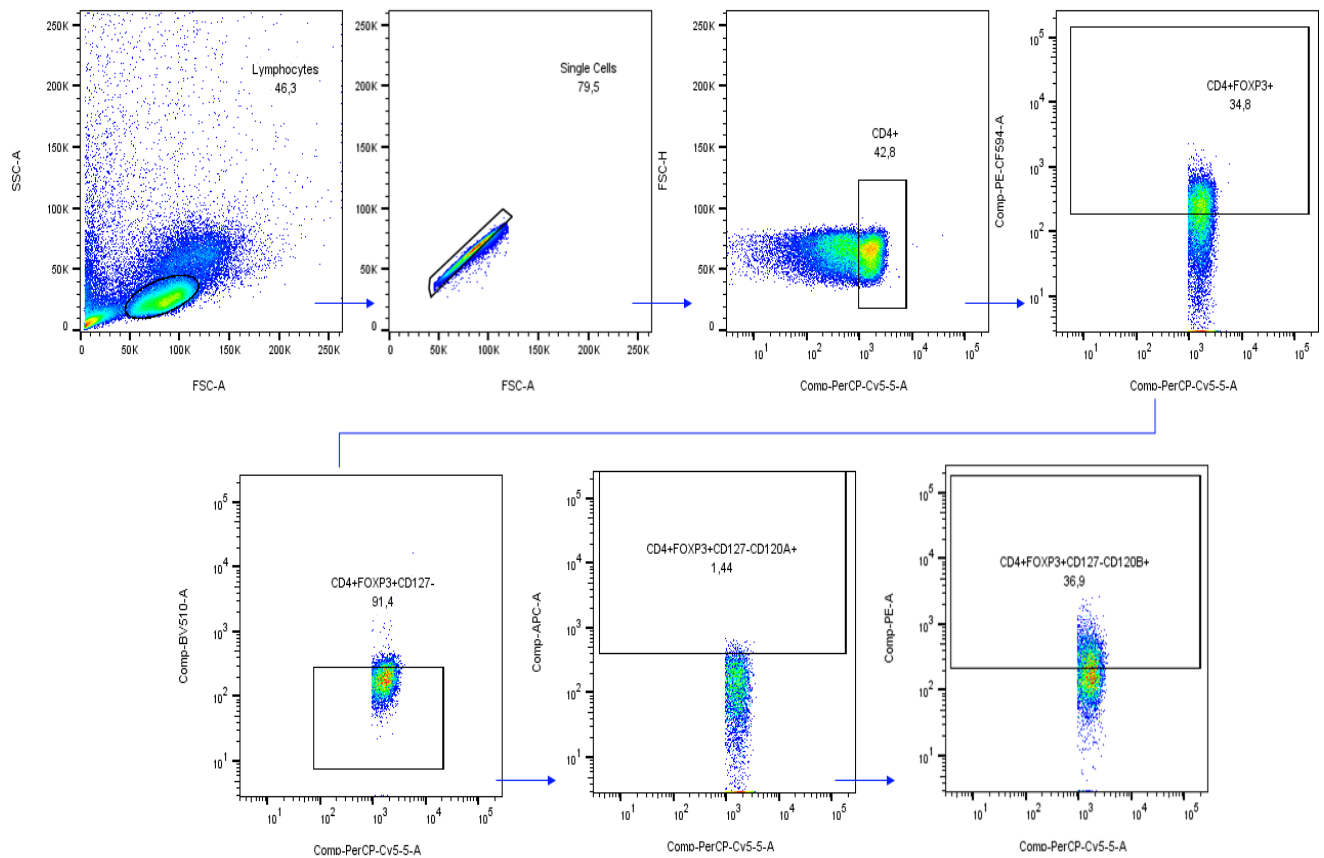
Figura 11- Estratégia de análise dos linfócitos TCD4+ e TCD8+



Fonte: O autor

A partir da identificação da população dos linfócitos T CD4+ e TCD8+, foi escolhido a região positiva para os marcadores APC (CD120A, TNFR1) e PE (CD120B, TNFR2), e das citocinas TNF e IL-10. Para os linfócitos T reg, essa identificação iniciou a partir da população de CD4+ expressando FOXP3. Após esse ajuste, aquela população negativa para CD127, ou seja, CD127- foi a mais bem caracterizada para esse tipo de células regulatórias. E a partir disso, as células regulatórias expressando os receptores também foram selecionados assim como para as outras populações avaliadas.

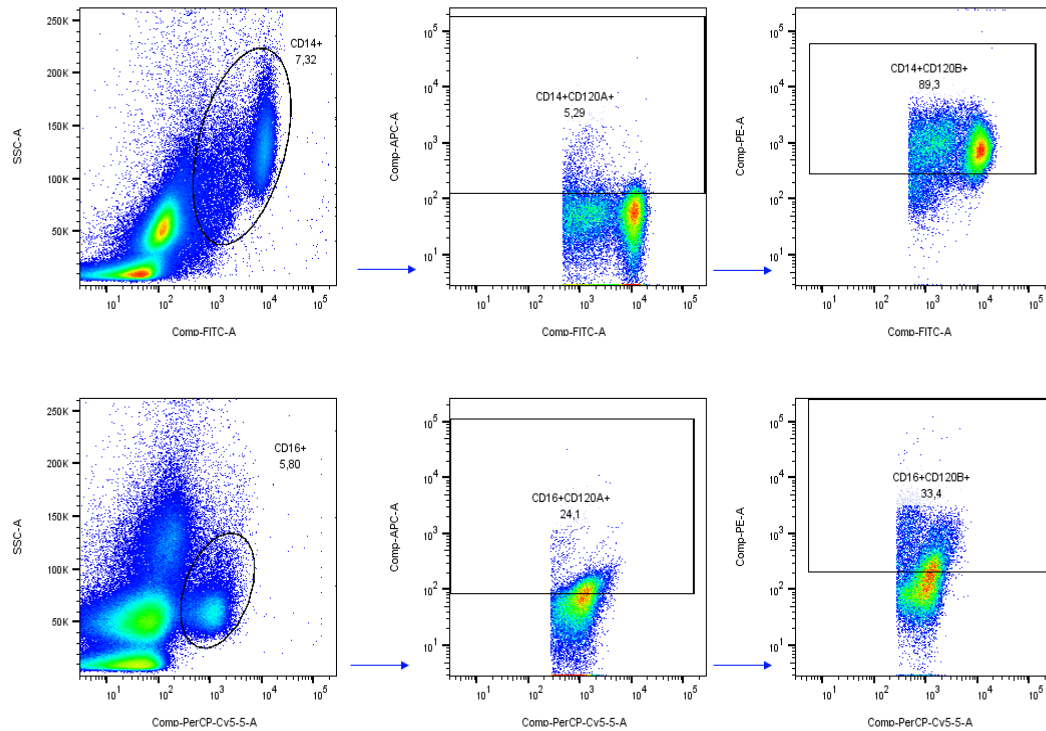
Figura 12 - Estratégia de análise para os linfócitos T regulatórios (T_{reg})



Fonte: O autor

A escolha da população de monócitos foi estabelecida de maneira diferente dos Linfócitos. Analisamos de duas maneiras: a primeira delas, considerando monócitos totais. A partir do gráfico de SSC vs CD14 e os monócitos (CD14+) foram selecionados. A partir da identificação dessas células, os receptores de TNF também foram selecionados, e a partir deles, as citocinas. Outra forma de análise foi selecionar as células CD16+ que expressavam os receptores bem como as citocinas, seguindo a mesma estratégia para células CD14+.

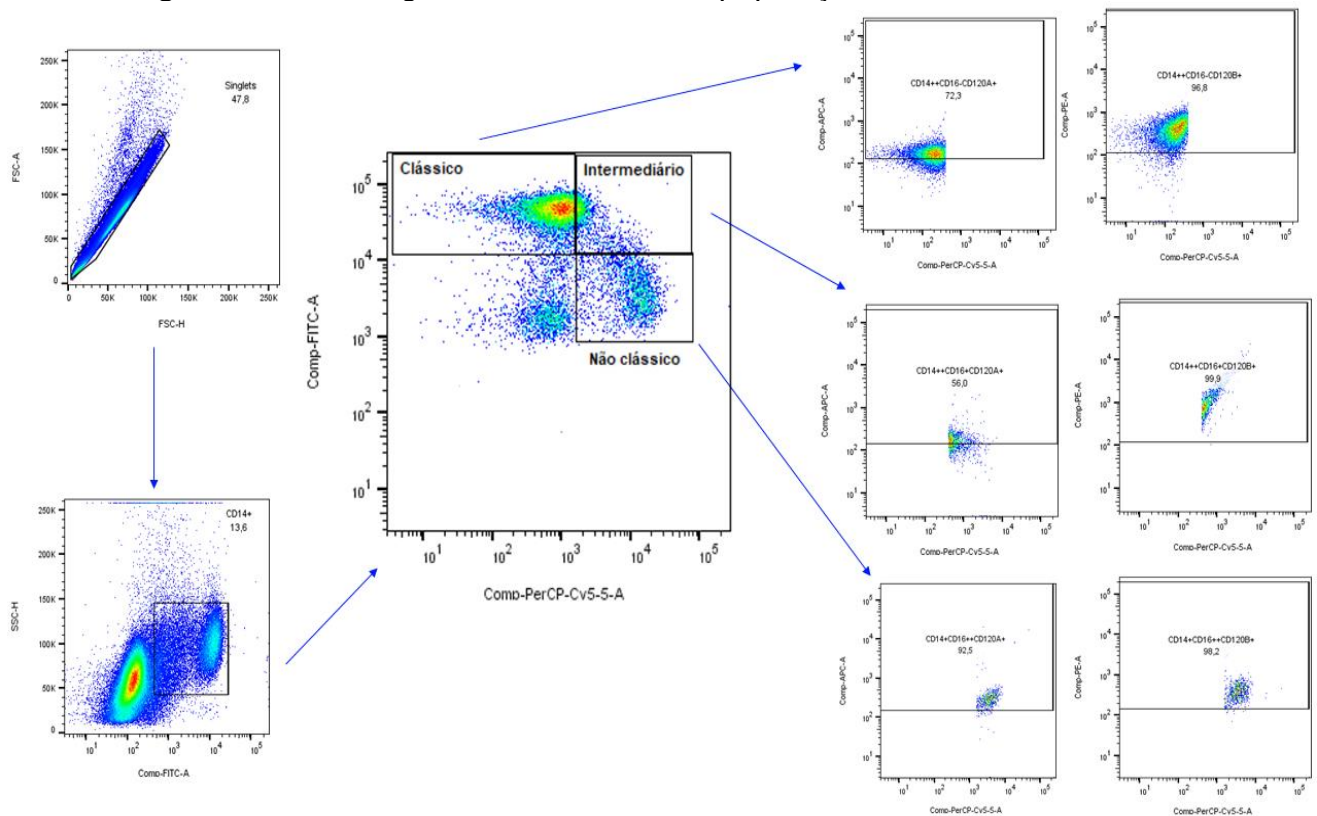
Figura 13 - Estratégia de análise de monócitos totais e de células CD16+



Fonte: O autor

A segunda forma de estratégia de análise dos monócitos foi a de diferenciar três diferentes tipos de subpopulações baseado na expressão de CD14 e CD16. Dessa forma foi possível identificar monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻ ou CD14^{high}CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺ ou CD14^{high}CD16⁺) e não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺ ou CD14^{low}CD16⁺). Ainda, para cada subpopulação selecionada foi identificado a porcentagem dos receptores de TNF e citocinas expressos por eles.

Figura 14 - Estratégia de análise das subpopulações de monócitos

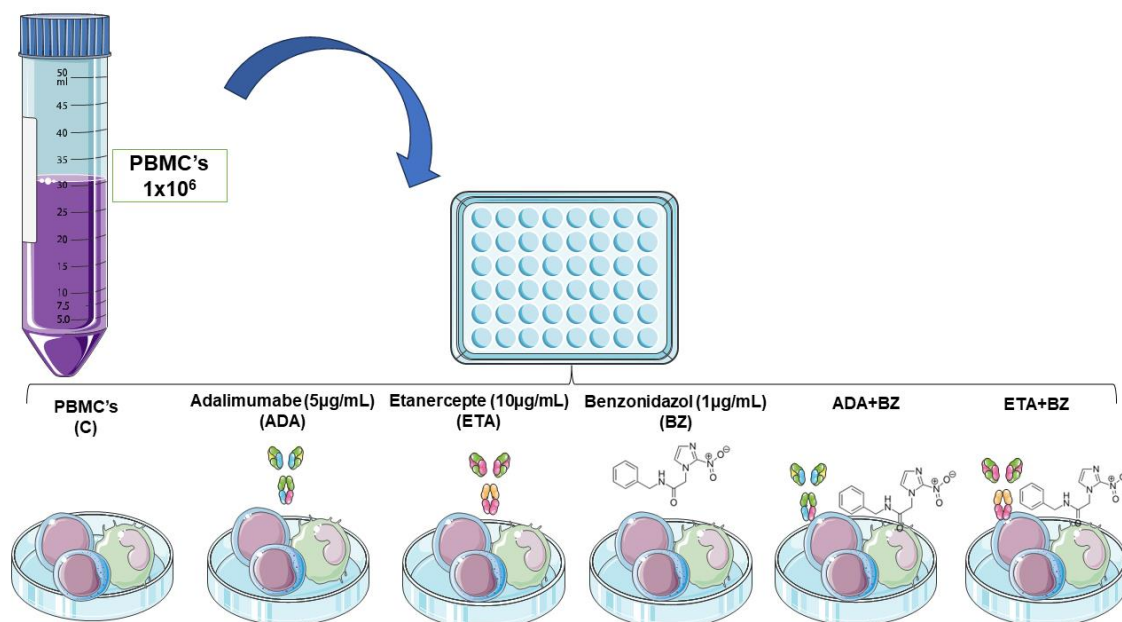


Fonte: O autor

5.6 Tratamento de cultura celular com drogas imunossupressoras

As PBMC's foram depositadas em placas de 48 poços numa concentração de 1×10^6 /mL contendo meio RPMI 1640 suplementado, tendo volume final de 1mL por poço. As condições de cultivo foram seis: células sem inibidores/tratamento (C), células tratadas isoladamente com duas drogas anti-TNF: Humira® (Adalimumab, ADA: 5µg/mL) e Enbrel® (Etanercepte (ETA: 10 µg/mL), Benzonidazol (BZ: 1µg/mL) e em associação Adalimumab + Benzonidazol (A+BZ), Etanercepte + Benzonidazol (E+BZ) (para o ajuste final das drogas em associação o cálculo foi realizado numa concentração de 4x) (Figura 15). A placa foi incubada em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C num período de 48h.

Figura 15. Condições de cultivo de PMBC's submetidas ao tratamento com drogas imunossupressoras e Benzonidazol



Fonte: O autor

5.7 Quantificação de citocinas do perfil Th1 e Th2 em sobrenadantes de cultura

Após 48h de cultura, os sobrenadantes foram coletados e estocados para dosagem das citocinas TNF, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-4 e IL-2 por *Cytometric Bead Array*. Primeiramente, 25µL da mistura de *beads* de captura, marcadas com anticorpos monoclonais foram transferidas para tubos de poliestireno (5mL) (BD Systems™) devidamente identificados. Em seguida, 25µL das amostras (sobrenadante) foram adicionados por 3h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente foram adicionados 25µL do reagente de detecção contendo anticorpos anti-citocinas alvos conjugadas à *Phycoerythrin* (PE) por 2h à Temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as *beads* foram lavadas e 300µL de solução tampão adicionados para ressuspensão das esferas. A aquisição foi realizada dentro de 24h utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (Beckton Dickson) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As análises foram realizadas através do Software FCAP Array versão 3.01 (Beckton Dickson).

5.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software PRISM 8.0.2 Windows® (E.U.A.). A apresentação das variáveis foi feita através de medidas descritivas como: média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e interquartil. Inicialmente foi aplicado o teste de normalidade, Shapiro-Wilk, para avaliação da distribuição das amostras. Diante da distribuição anormal das amostras, foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido dos pós teste de comparações múltiplas de Dunn. Já para a comparação das condições de cultivo dentro do mesmo grupo de pacientes foi aplicado o teste de Friedman seguido dos pós teste de comparações múltiplas de Dunn. Para comparação de dois grupos não pareados foi aplicado o teste de Mann-Whitney. A avaliação das correlações foi realizada através do teste de correlação não-paramétrica de Spearman. O coeficiente de correlação (r) varia de -1 a +1; valores +1 indicam uma correlação positiva perfeita; 0 a 1 indicam que as duas variáveis tendem a aumentar ou diminuir juntas; 0 indica que as duas variáveis não variam em conjunto; 0 a -1 uma variável aumenta à medida que a outra diminui; -1 indica uma correlação negativa perfeita. Então essas correlações são classificadas como fraca, quando r : 0,00 a 0,29; baixa, quando r : 0,30 a 0,49; moderada, quando r : 0,50 a 0,69; forte, quando r : 0,70 a 0,89 e muito forte quando r : 0,90 a 1,00. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

5.9 Considerações éticas

Os indivíduos, portadores ou não portadores da doença de Chagas, que participaram dessa pesquisa foram incluídos voluntariamente após consentimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A e B). As informações sobre o projeto de pesquisa “Prospecção De Biomarcadores De Evolução Clínica e De Tratamento Etiológico Na Doença De Chagas” foram fornecidas antes da coleta de sangue. Tais informações se constituíram em esclarecer a importância da inclusão dos portadores no estudo bem como sobre a liberdade de recusarem a participação, sem prejuízo ou danos no atendimento feito no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto- Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)/UPE. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos do IAM/FIOCRUZ (CAEE:

20049919.5.0000.5190) (Anexo A) e pela instituição coparticipante HUOC/PROCAPE, em conformidade com as resoluções vigentes: 466/12, Norma Operacional001/13 CNS-MS não havendo, portanto, nenhum impedimento ético.

6 RESULTADOS

6.1 Artigo 1: É uma correlação negativa entre sTNFR1 e TNF em pacientes com doença de Chagas crônica a chave para progressão clínica? **Immunobiology. Elsevier. Qualis: Fator de impacto.**



Is a negative correlation between sTNFR1 and TNF in patients with chronic Chagas disease the key to clinical progression?

Diego José Lira Torres^a, Tiago Ribeiro De Arruda^a, Michelle da Silva Barros^a, Juliana Prado Gonçalves^b, Ana Karine Araújo Soares^c, Kamila Kássia dos Santos Oliveira^a, Leyllane Rafael Moreira^a, Carolina Medeiros^d, Maria da Gloria Aureliano Melo Cavalcanti^d, Sílvia Marinho Martins^d, Cristina Carrazzone^d, Wilson Oliveira^d, Joseli Lannes-Vieira^e, Virginia Maria Barros de Lorena^{a,*}

^a Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Aggeu Magalhães, Laboratório de Imunoparasitologia, Recife, PE, Brazil

^b Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Laboratório de Virologia, Recife, PE, Brazil

^c Fundação Altino Ventura - FAV, Recife, PE, Brazil

^d Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^e Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia das Interações, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

RESUMO

Os receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) são inibidores endógenos naturais de TNF e estão elevados em doenças inflamatórias, doenças autoimunes e doenças crônicas degenerativas. Na doença de Chagas, a citocina TNF é pleiotrópica e considerada chave em imunopatologia. Assim, objetivamos avaliar os níveis de TNF, sTNFR1 e sTNFR2 no soro de pacientes com doença de Chagas crônica. O TNF e seus receptores solúveis foram quantificados por *Citometric Bead Array* no soro de 132 pacientes, dos quais 51 tinham a forma indeterminada (IND), 39 a forma cardíaca leve (CARD 1), 42 a forma cardíaca grave (CARD 2) e 20 indivíduos não infectados (NI). Os resultados indicam que os receptores solúveis podem regular o TNF na doença de Chagas, já que seus níveis foram maiores em indivíduos infectados por *T. cruzi* quando comparado a indivíduos não infectados. Encontramos uma correlação negativa moderada entre sTNFR1 e TNF em indivíduos com a forma IND, sugerindo relação com a não progressão para quadro mais graves, como a forma cardíaca. sTNFR1 e sTNFR2 estavam aumentados em todas as formas clínicas, mas com correlação moderada positiva em pacientes mais graves ($r = 0,50$ e $p = 0,0005$). Os níveis de TNF não mostraram diferenças estatísticas nos grupos de pacientes. Esses achados sugerem a importância do equilíbrio endógeno dos níveis dos receptores solúveis do TNF na proteção e equilíbrio em pacientes com doença de Chagas crônica, além de revelar a complexidade imunológica em indivíduos com infecção crônica por *T. cruzi*.

Palavras-chave: Doença de chagas, Cardiomiopatia chagásica, TNF-alfa, TNFR1, TNFR2

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta mais de 8 milhões de pessoas em todo o mundo e aproximadamente 70 milhões de pessoas estão sob risco de infecção (WHO, 2015). DC é distribuído em mais de 21 países da América Latina, causando mais de 10.000 mortes anualmente, sendo um grave problema de saúde pública no Brasil devido os atuais surtos de infecção oral, exigindo medidas sanitárias urgentes (Pérez-Molina e Molina, 2018).

Indivíduos com a forma clínica crônica indeterminada apresentam testes sorológicos reagentes, mas com exames de imagem normais e sem sintomas (Echavarría et al., 2020). Essa manifestação clínica é responsável pela maioria dos casos, sendo uma condição na qual o portador apresenta um bom prognóstico e tem a mesma expectativa de vida de uma pessoa sem DC (Echavarría et al., 2020).

No entanto, indivíduos assintomáticos podem evoluir para formas sintomáticas após 10 a 30 anos de infecção. A forma cardíaca, ou cardiopatia chagásica crônica (CCC), é a manifestação sintomática crônica mais grave, afetando cerca de 30% dos indivíduos infectados (Lidani et al., 2019). No tecido cardíaco do portador crônico de DC, o infiltrado inflamatório é desproporcional à quantidade de parasita que persiste no coração e outros tecidos. Esse infiltrado excessivo associado à resposta imune celular leva a danos teciduais extensos e irreparáveis (Dutra et al., 2009; Gutierrez et al., 2009).

Não está claro quais mecanismos específicos estão envolvidos na evolução clínica do portador da forma indeterminada para formas sintomáticas, mas acredita-se que a resposta imune ao protozoário desempenha um papel importante (Perez et al., 2011; De Bona et al., 2018; Pérez-Mazliah et al., 2021). As citocinas produzidas por linfócitos ativados regulam o sistema imunológico e estão implicados na resistência à infecção e na evolução clínica de indivíduos infectados por *T. cruzi* (Acevedo et al., 2018).

Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC's) especialmente monócitos/ macrófagos e o plasma de pacientes com IND produzem significativamente maiores quantidades de IL-10 em comparação com indivíduos com doença cardíaca, sugerindo um controle da morbidade, principalmente nas fases tardias, quando os níveis são mais elevados (Lorena et al., 2010; Souza et al.,

2014). Em contraste, citocinas pró-inflamatórias, como interferon gama (IFN- γ), TNF e IL-17, estão em níveis mais elevados em TCD4, TCD8 e monócitos, em além de soro e plasma de pacientes com doença cardíaca e possivelmente representam piora da função cardíaca (Souza et al., 2014; Alvarado-Arnez et al., 2018; Almeida et al., 2018; Curvo et al., 2018).

O TNF foi descrito em 1973 como uma endotoxina que causava necrose em tumores *in vitro* (Carswell et al., 1975). Altamente inflamatório e considerada a citocina mais pleiotrópica, o TNF desempenha funções em vários tipos de células e está associado a várias doenças infecciosas, autoimunes, patologias neoplásicas e inflamatórias (Sedger e Mcdermott, 2014, Jang et al., 2021). TNF é expresso inicialmente na forma transmembrana (mTNF) em várias células imunes, como monócitos/macrófagos, células NK e linfócitos T, além de células endoteliais, fibroblastos e cardiomiócitos (Issuree et al., 2013). Pela ação de enzima conversora de TNF (TACE), o mTNF é convertido em TNF (sTNF), que é a forma circulante com capacidade endócrina de atuar em locais distantes (Sedger e Mcdermott, 2014).

O sTNF e mTNF se liga a receptores transmembrana, TNFR1 ou CD120a e TNFR2 ou CD120b, com mTNF um ligante mais poderoso para TNFR2 e sTNF para TNFR1. O TNFR1 é encontrado constitutivamente na maioria das células, enquanto o TNFR2 tem uma expressão muito mais restrita em células imunes (Holbrook et al., 2019). Esses receptores também podem ser clivados e se tornarem receptores solúveis tipo 1 e 2 (sTNFR 1/2) que são considerados potentes inibidores naturais do TNF, uma vez que podem competir pelo sítio de ligação do TNF (Ahmad e outros, 2018). Foi demonstrado *in vivo* que a rota TNF/TNFR1 desempenha um papel importante na infecção por *T. cruzi*, uma vez que camundongos TNFR1-*knockout* não sobrevivem à infecção devido à alta parasitemia, desequilíbrio imunológico e caquexia (Kroll-Palhares et al., 2008; Villar et al., 2013).

Além disso, receptores solúveis limitam a atividade deletéria do TNF (Truyens et al., 1999). Em humanos, o TNF parece ser um importante mediador inflamatório nos mecanismos imunopatológicos durante a fase crônica da doença de Chagas. Portanto, avaliar os receptores solúveis, que são inibidores do TNF, pode melhorar a compreensão do quadro clínico crônico bem como da evolução da infecção e busca de novos biomarcadores.

MATERIAIS E MÉTODOS

População e local do estudo

Este estudo foi conduzido de acordo com as recomendações do comitê da FIOCRUZ/PE (CAAE: 0022.0.095.000-07 e 0032.095.000-10). Todos os indivíduos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com as diretrizes da Resolução CNS 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério de Saúde do Brasil. Cento e trinta e dois pacientes chagásicos crônicos foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE)/Universidade de Pernambuco (UPE). Indivíduos que receberam tratamento anterior com Benzonidazol e/ou que apresentavam queixas digestivas foram excluídos do estudo. A classificação clínica foi realizada por cardiologistas após o II Consenso Brasileiro sobre Doença de Chagas (Dias et al., 2016). Foram incluídos no estudo após confirmação sorológica e exame de imagem tais como: Ecocardiograma (ECO), Eletrocardiograma (ECG), Raios-X de tórax e esôfago. Assim, os pacientes foram classificados como Indivíduos infectados por *T. cruzi* na forma indeterminada (IND) (n = 51, faixa etária: 30 a 75 anos), com sorologia reagente e eletrocardiograma, raio X de tórax, esôfago e cólon normais; indivíduos com a forma cardíaca leve (CARD 1) (n = 39, faixa etária: 41–88 anos) com ECG e ECO alterados, função ventricular $\geq 45\%$ e ausência de insuficiência cardíaca; Indivíduos infectados por *T. cruzi* na forma cardíaca grave (CARD 2) (n = 42, faixa etária: 24-76 anos) com ECG e ECO alterados, mas já com insuficiência cardíaca compensada (Tabela 1). Além disso, 20 indivíduos não infectados (NI, idade: Min-Max: 18–38 anos) foram incluídos no estudo como controles negativos, que não residiram em área endêmica para doença de Chagas, nunca receberam transfusão de sangue e apresentaram teste sorológico “não reagente” para doença de Chagas.

Coleta de sangue e sorologia

Foram coletados dez mililitros de sangue em tubos sem anticoagulantes para obtenção do soro. As amostras foram aliquotadas e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no banco de soro do Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM). A confirmação da infecção foi realizada através do uso de dois

testes imunoenzimáticos: ELISA convencional, utilizando um kit de teste Chagas III ELISA (Biochile, Grupo Bio, Santiago, Chile); e ELISA recombinante, usando um kit comercial Wama Imuno-ELISA (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil) de acordo com a recomendação dos fabricantes.

Tabela I

Caracterização clínica e epidemiológica dos pacientes

	NI	IND	CARD 1	CARD 2
Número de pacientes	20	51	39	42
Região^a				
Agreste	-	9 (17.6%)	10 (25.6%)	13 (31%)
Mata	-	7 (13.7%)	12 (30.8%)	13 (31%)
Metropolitana	19 (95%)	7 (13.7%)	5 (12.8%)	4 (9.40%)
Sertão	-	20 (39.2%)	9 (23.1%)	6 (14.3%)
Outros estados	1 (5%)	8 (15.7%)	3 (7.69%)	6 (14.3%)
Ecocardiograma FEVE (%)	-	66.9 ± 5.0	63.2 ± 7.4	39 ± 12.9*. ###

NI: Não infectado; IND: forma indeterminada; CARD 1: forma cardíaca leve; CARD 2: forma cardíaca grave. FEVE: Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo.^a resultados apresentados como frequência.

*, $P < 0.0001$, CARD 2 vs IND; ### $P < 0.0001$, CARD2 vs CARD1 (Teste de Mann-Whitney)

Quantificação de receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) e TNF em amostras de soro por Cytometric Bead Array (CBA)

Os níveis de sTNFR1, sTNFR2 e TNF foram quantificados nas amostras de soro de indivíduos através do Human Flex TNF, sTNFR1 e sTNFR2 Cytometric Bead Sistema Array (CBA) (Catálogo No. 558273, 560,156 e 560155; Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. As beads foram adquiridos em 24 h usando o citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson) e analisados através do software FCAP Array versão 3.01 (Becton Dickinson). O limite de detecção da curva padrão para TNF, sTNFR,1 e sTNFR2 foram 3,08, 1,81 e 2,27 pg/mL, respectivamente.

Análise Estatística

As variáveis foram apresentadas como medidas descritivas: média, mediana e desvio padrão. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste D'Agostino-Pearson, onde se verificou que os dados eram não paramétricos. Posteriormente, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos. Uma vez que a associação foi verificada, o teste de Mann-Whitney foi utilizado para

comparações quantitativas de receptores e citocinas entre os grupos. A avaliação das correlações entre TNFR1/2 versus TNF, TNFR1 versus TNFR2 e TNFR1/ 2, e TNF versus fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foi realizada usando o teste de correlação de Spearman. A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) e os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Pacientes com doença de Chagas têm níveis aumentados de receptores solúveis de TNF – Nós descobrimos que sTNFR1 e sTNFR2 estão elevados em portadores crônicos de Doença de Chagas quando comparado a indivíduos não infectados (NI) (Fig. 1b e 1c) ($p < 0,0001$). Analisamos a concentração sorológica desses receptores na presença de doença cardíaca, comparando o grupo IND com os grupos CARD (CARD1 e 2), mas as diferenças entre as formas clínicas não foram estatisticamente significativas. Os níveis de sTNFR1 e sTNFR2 estavam aumentados em todas as formas clínicas, mas sTNFR1 correlaciona-se negativamente com TNF no soro de pacientes com forma indeterminada. Correlacionamos os níveis de TNF com seus receptores na Formas clínicas IND e CARD (Tabela 2). Encontramos uma correlação negativa baixa ($r = 0,38$; $p = 0,0058$) entre sTNFR1 e TNF, sugerindo que conforme o sTNFR1 aumenta, os níveis de TNF diminuem no grupo IND. Houve nenhuma correlação significativa entre sTNFR2 e TNF em indivíduos crônicos e nem entre sTNFR1 e TNF em CARD 1 e CARD 2.

Ao correlacionar sTNFR1 versus sTNFR2, encontramos uma correlação positiva em indivíduos com infecção crônica por *T. cruzi*, mas o grupo com forma cardíaca grave (CARD 2) apresentou uma correlação (R) mais elevada quando comparada IND e CARD 1, resultando em correlação moderada ($r: 0,50$) (fig. 2). Para avaliar a relação de sTNFR1 e sTNFR2 com o grau de disfunção cardíaca (sTNFR vs %LVEF) fizemos uma correlação com os dados na porcentagem da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (%FEVE). No entanto, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi encontrada.

Concentração de TNF abaixo do limite de detecção

Analizamos os níveis sorológicos de TNF, que não só apresentou diferença estatística entre os grupos, mas também seus níveis permaneceram abaixo do limite de detecção (3,08 pg/mL). Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (Fig. 1a), a forma IND apresentou menor Níveis de TNF (mediana: 0,39 pg/mL) quando comparados a indivíduos não infectados e formas cardíacas (mediana: 0,48 e 0,45 pg/mL, respectivamente) (Fig. 1a)

TABELA II

Correlação entre a concentração sorológica de sTNFR1 e sTNFR2 em portadores da doença de Chagas crônica.

	IND		CARD 1		CARD 2		ALL	
	r	p	r	p	r	p	r	p
sTNFR1 vs TNF	-0.38	0.0058	-0.16	0.3256	-0.05	0.7426	-0.19	0.0240
sTNFR2 vs TNF	-0.24	0.0820	0.22	0.5251	-0.20	0.1942	-0.11	0.1873

Legenda: r: Rank de Spearman ; p: *p value*

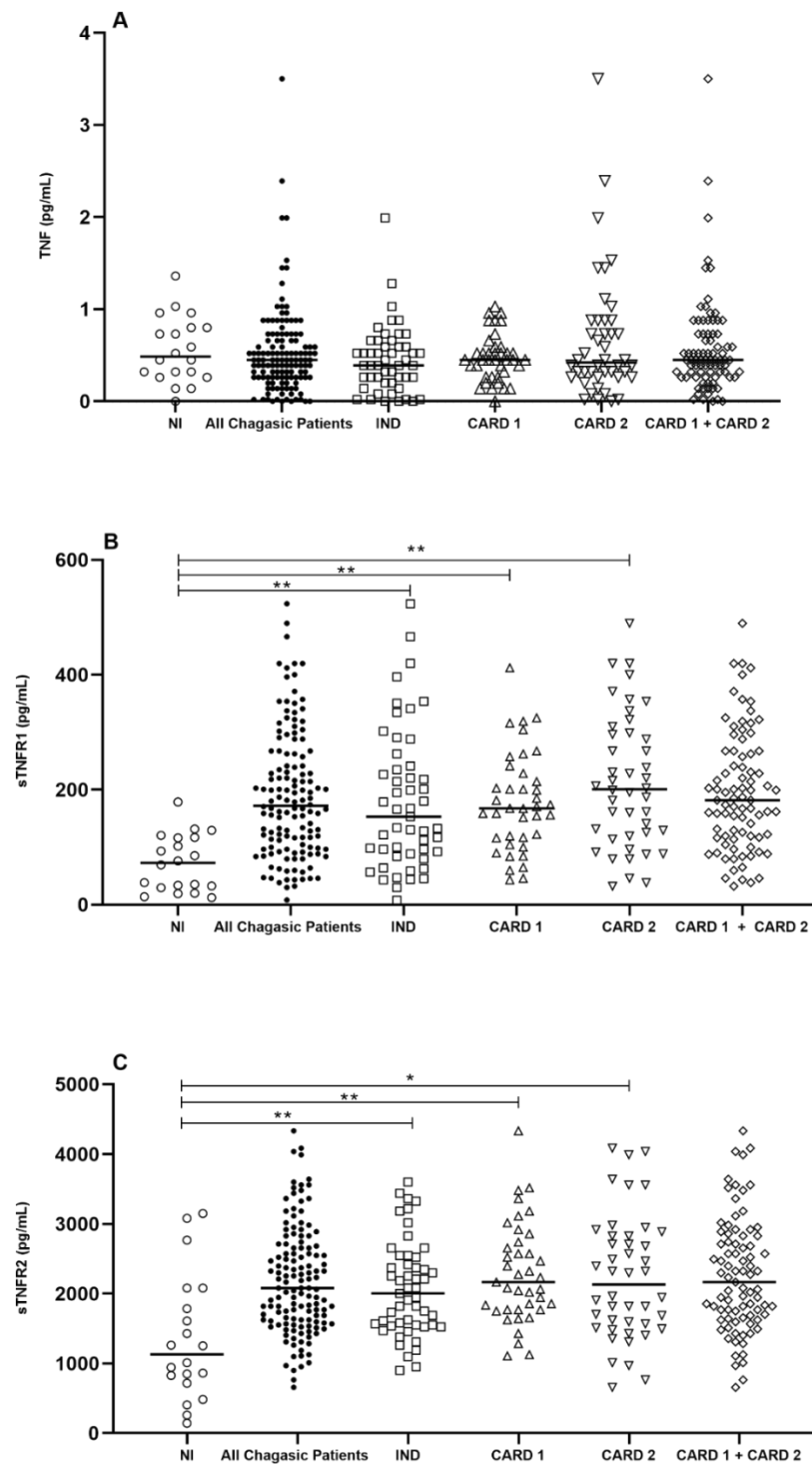


Fig. 1. A) Os níveis de TNF não se alteram em pacientes com doença de Chagas e permanecem abaixo do limite de detecção. B) e C): Aumento dos receptores solúveis de TNF no soro de pacientes com doença de chagas.

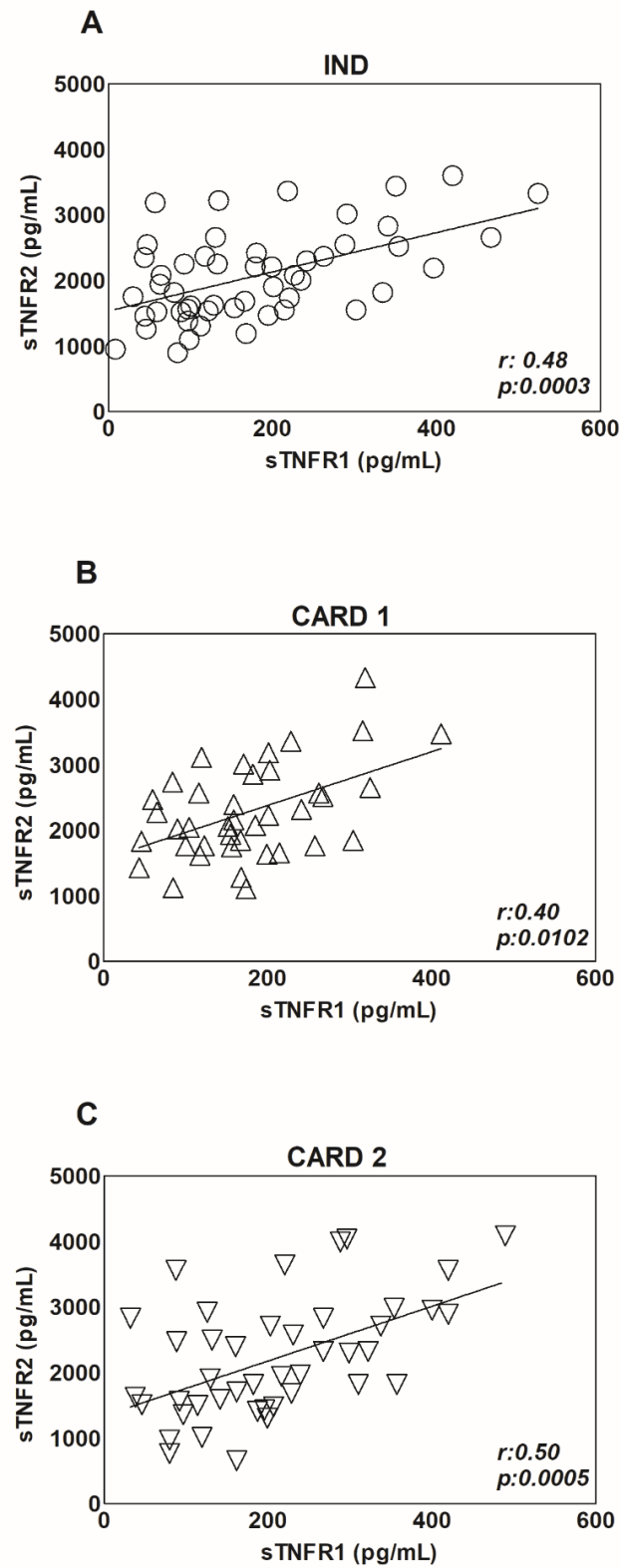


Fig. 2. Ambos os receptores aumentam no soro de pacientes com doença de Chagas com forte correlação na forma clínica mais grave. Legenda: IND: indeterminado forma; CARD 1: forma cardíaca leve; CARD 2: forma cardíaca grave.

DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram que a via TNF/TNFR1 tem um papel importante no controle da parasitemia, indução de inflamação, caquexia e sobrevivência de animais infectados com *T. cruzi* (Truyens et al. 1999; Kroll-Palhares et al., 2008). Além disso, sabe-se que os receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) são potentes inibidores endógenos naturais de TNF (Van Zee et al., 1992). Assim, nosso objetivo foi dosar os receptores sTNFR1 e sTNFR2 em portadores com doença de Chagas crônica para melhor entender seu papel nos mecanismos de TNF e determinar se essas moléculas podem ser relevantes biomarcadores imunológicos da gravidade e/ou prognóstico da doença de Chagas.

Os resultados mostraram que indivíduos com doença de Chagas crônica têm níveis mais altos de sTNFR do que indivíduos não infectados (Fig. 1b e 1c). Sendo a doença de Chagas uma patologia inflamatória crônica, esse achado é esperado e corrobora com estudos de outras doenças inflamatórias autoimunes (Arias et al., 2014; Kim et al., 2016) e infecção parasitária (Bessa et al., 2012; Rostami et al., 2016). Nossos achados corroboram com estudos ex-vivo que relataram níveis de sTNFR2 muito maior no plasma e soro de humanos infectados (García et al., 2008). González et al. (2018) descobriram que os níveis de TNFR2 eram maiores em células sanguíneas periféricas de pacientes com a forma indeterminada ou cardíaca da doença de Chagas em comparação com indivíduos não infectados. (Fig. 1c). Por outro lado, os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos de TNF nem TNFR1 entre os pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica.

Mocelin et al. (2005) não encontraram nenhuma diferença estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos de sTNFR1 entre infectados por *T. cruzi* e indivíduos não infectados. No entanto, o pequeno número de pacientes e a técnica utilizada pelos autores pode ter enviesado o estudo. Para avaliar os receptores solúveis de TNF, utilizamos um kit CBA que apresenta algumas vantagens sobre Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). TNFR1 é importante no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, mas não linfócitos para o local de inóculo, uma vez que camundongos deficientes em TNFR1 não apresentam essas células da resposta imune inata nos locais de inóculo (Aliberti et al., 2001). Em tecidos cardíacos de

camundongos TNFR1^{-/-}, apresentaram diminuição nos linfócitos TCD4 e TCD8, demonstrando o papel do receptor na indução de miocardite, especialmente composto por linfócitos durante a infecção aguda (Kroll-Palhares et al., 2008).

Embora não tenhamos estudado a expressão de receptores transmembrana (mTNFR) e não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre as formas clínicas da doença de Chagas (IND, CARD1 e CARD2), os níveis médios de sTNFR1 tendem a aumentar nesses grupos de pacientes (Fig. 1a). Observamos uma correlação moderada entre níveis de sTNFR1 e sTNFR2 nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas (Fig. 2). No entanto, a correlação entre sTNFR2 e sTNFR1 foi ligeiramente maior na forma cardíaca mais grave do que na forma cardíaca leve (Fig. 2c), que poderia levar a efeitos regulatórios sobre a atividade do TNF e, assim, atenuar suas ações deletérias sobre o tecido cardíaco.

Esta ideia também pode ser apoiada pelas correlações feitas entre sTNFR e ejeção ventricular esquerda fração (sTNFR1 versus % LVEF; sTNFR2 versus % LVEF), que é considerado o parâmetro mais importante na avaliação da função sistólica e o melhor indicador prognóstico de sobrevida em pacientes cardíacos. Em outras palavras, os receptores não se correlacionam com o dano cardíaco, mas podem atuar como reguladores, pois aumentam nos casos mais graves forma cardíaca.

Em análises de outras funções cardíacas, Silva et al. (2020) descobriram que altos níveis plasmáticos de sTNFR estão associados com disfunção sistólica e dilatação cardíaca em pacientes com cardiopatia chagásica. O TNF desempenha um papel benéfico durante a fase aguda em animais infectados, mas também desencadeia efeitos nocivos, como caquexia e morte. Em geral, esses efeitos são limitados pela ação endógena de sua receptores e determinam o resultado da infecção. Descobriu-se que o sTNFR2 está mais associado a uma atividade neutralizante da citocina TNF no plasma de camundongos. Razões baixas de sTNFR/TNF foram associadas com mortalidade e caquexia em animais infectados não tratados e naqueles tratados com anticorpo anti-TNF TN3 (Truyens et al., 1999).

Analizamos a correlação entre sTNFR1 e TNF em indivíduos com as formas crônicas da doença e encontramos uma correlação negativa moderada: enquanto os níveis de sTNFR1 aumentam, os níveis de TNF diminuem (Tabela II). Está bem estabelecido que a forma indeterminada representa um equilíbrio entre hospedeiro e parasita. Diante disso, nossas descobertas suportam a hipótese de que o receptor

sTNFR1 regula a atividade do TNF em indivíduos com a forma indeterminada, atenuando os efeitos danosos de TNF em órgãos alvo da doença e, consequentemente, retardando a progressão da doença para uma forma mais grave (Dutra et al., 2014). Estudos usando plasma ou sobrenadante de cultura celular coletado de humanos mostraram que os níveis de TNF aumentam em pacientes com CCC em comparação com pacientes com a forma IND e que esse aumento é diretamente relacionado a danos cardíacos (Alvarado-Arnez et al., 2018). Não encontramos níveis mais elevados de TNF nos grupos CARD 1 e CARD 2 (Fig. 1a).

Como a concentração sérica de TNF em nosso estudo estava abaixo do limite estipulado pelo kit, plotamos amostras nunca congeladas ou congelado apenas uma vez para descartar a hipótese de degradação da citocina durante o experimento. Também descartamos a possibilidade de qualquer defeito no kit CBA Flex TNF porque a curva era linear ($R^2 = 98,96\%$). Portanto, acreditamos que o consumo de TNF ocorreu nos locais inflamados do organismo, principalmente em pacientes a forma cardíaca. Além disso, os efeitos da diluição no sangue e uma liberação direcionada de TNF em órgãos, especialmente o coração, podem não se refletir nos níveis circulatórios (García et al., 2008).

Estudos recentes têm mostrado que os níveis plasmáticos de TNF não apresentam alterações significativas em indivíduos com infecção crônica por *T. cruzi* (Gonzalez et al., 2018), com diferença apenas no grupo sem a doença e que os níveis dessa citocina em indivíduos infectados por *T. cruzi* estão abaixo o limite de detecção para TNF (3 pg/mL), o mesmo limite de detecção encontrado em nossos resultados (Gómez-Olarte et al., 2019). Outros estudos mediram a níveis de IFN- γ e TNF no soro de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Os níveis séricos de TNF e IFN- γ não diferiram entre formas clínicas nem com o grau de gravidade da doença (Vasconcelos et al., 2015). Nossos resultados corroboraram com esses achados e mostraram que aqueles com a forma IND têm os níveis mais baixos de TNF. Indivíduos com a forma IND apresentam um perfil menos inflamatório, mas com persistência do parasita (Curvo et al., 2018). Também acreditamos que esta diminuição do TNF está relacionada com a falta de ativação de um perfil Th1 ou que outros perfis celulares, como Th17, contribuem mais para a eliminação do *T. cruzi*. Portanto, outras citocinas devem ser avaliadas, como IL-10 e IL-17 (Cai et al., 2016). Em modelos *in vitro*, a IL-10 atua inibindo a atividade pró-inflamatória do TNF indiretamente por aumentar os receptores solúveis e diminuir os

receptores transmembrana ou inibindo diretamente a liberação de TNF (Joyce et al., 1994).

CONCLUSÃO

Todos os resultados sugerem a importância do equilíbrio endógeno de receptores solúveis de TNF, que podem indicar proteção para pacientes com doença de Chagas crônica. Além disso, a rota TNF/TNFR1 parece ser primordial no curso da doença em humanos. Nossos resultados da citocina TNF corroboram outros estudos recentes e destacam a complexidade da resposta imune contra o *T. cruzi* na DC crônica. Como perspectivas, pretendemos abordar os mecanismos de atividade do TNFR na célula sanguínea periférica de pacientes com doença de Chagas. Estudos sobre perfis de citocinas e frequência de receptores envolvidos na apoptose também contribuiriam para um melhor entendimento da imunopatologia da doença de Chagas crônica.

Declaração de contribuição de autoria

Diego José Lira Torres: Conceituação, Metodologia, Software, Validação, Análise formal, Investigação, Curadoria de dados, Visualização. **Tiago Ribeiro de Arruda:** Metodologia, Validação. **Michele da Silva Barros:** Análise formal, curadoria de dados, investigação. **Juliana Prado Gonçalves:** Análise formal, Curadoria de dados, Investigação. **Ana Karine Araújo Soares:** Validação. **Kamila Kássia dos Santos Oliveira:** Metodologia, Validação. **Leyllane Rafael Moreira:** Metodologia, Validação. **Carolina Medeiros:** Metodologia. **Maria da Glória Aureliano Melo Cavalcanti:** Metodologia. **Sílvia Marinho Martins:** Metodologia. **Cristina Carrazzone:** Supervisão. **Wilson Oliveira:** Supervisão. **Joseli Lannes-Vieira:** Conceituação, Análise formal, Redação – revisão e edição. **Virgínia Maria Barros de Lorena:** Conceituação, Metodologia, Recursos, Curadoria de dados, Redação – revisão e edição, Supervisão, Administração de projetos, Captação de recursos

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes conhecidos ou relacionamentos pessoais que possam parecer influenciar o trabalho relatado neste artigo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os pacientes que se voluntariaram no estudo; ao Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Atendimento de Pernambuco (PROCAPE); e ao Instituto Aggeu Magalhães por todo apoio técnico e científico. Além disso, os autores agradecem o apoio financeiro das seguintes instituições: a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior Pessoal (CAPES); Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (Universal/CNPq 474926/2012-5); e o Programa de Excelência em Pesquisa da Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Proep-Facepe APQ-1703-2.11/15).

Referências

- Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relev Epidemiol Hebd.* 2015;90: 33–43. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671846>.
- Pérez-Molina, J.A., Molina, I., 2018. Chagas disease. *Lancet* 391 (10115), 82–94.
- Echavarría, N.G., Echeverría, L.E., Stewart, M., Gallego, C., Saldarriaga, C., 2020. Chagas disease: chronic Chagas cardiomyopathy. *Curr. Probl. Cardiol.* 1, 100507.
- Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., Sandri, T.L., 2019. Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. *Front. Public Health* 7, 166. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>. PMID: 31312626; PMCID: PMC6614205.
- Dutra, W.O., Menezes, C.A.S., Villani, F.N.A., et al., 2009. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (1), 208–218.
- Gutierrez, F.R.S., Guedes, P.M.M., Gazzinelli, R.T., Silva, J.S., 2009. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31 (11), 673–685.
- Pérez, A.R., Silva-Barbosa, S.D., Roggero, E., Calmon-Hamaty, F., Villar, S.R., Gutierrez, F.R., et al., 2011. Immunoendocrinology of the thymus in Chagas disease. *NeuroImmunoModulation* 18 (5), 328–338.

- De Bona, E., Lidani, K.C.F., Bavia, L., Omidian, Z., Gremski, L.H., Sandri, T.L., Messias Reason, I.J., 2018. Autoimmunity in chronic Chagas disease: a road of multiple pathways to cardiomyopathy. *Front. Immunol.* 9, 1842.
- Pérez-Mazliah, D., Ward, A.I., Lewis, M.D., 2021. Host-parasite dynamics in Chagas disease from systemic to hyper-local scales. *Parasite Immunol.* 43, e12786 <https://doi.org/10.1111/pim.12786>.
- Acevedo, G.R., Girard, M.C., Gómez, K.A., 2018. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. *Front. Immunol.* 9, 1929.
- Lorena, V.M., Lorena, I.M., Braz, S.C., Melo, A.S., Melo, M.F., Melo, M.G., et al., 2010. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand. J. Immunol.* 72 (6), 529–539.
- Souza, G.R., Gomes, J.A.S., Fares, R.C.G., et al., 2014. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. *PLoS ONE* 9, 1–9.
- Alvarado-Arnez, L.E., Batista, A.M., Alves, S.M., Melo, G., Lorena, V.M.B., Cardoso, C.C., et al., 2018. Single nucleotide polymorphisms of cytokine-related genes and association with clinical outcome in a Chagas disease case-control study from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113 (6), e170489.
- Almeida, M.S., Lorena, V.M.B., Medeiros, C.A., et al., 2018. Alternative Th17 and CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ cell frequencies increase and correlate with worse cardiac function in Chagas cardiomyopathy. *Scand. J. Immunol.* 87, 1–11. Curvo, E.O.V.,
- Ferreira, R.R., Madeira, F.S., et al., 2018. Correlation of transforming growth factor- β 1 and tumour necrosis factor levels with left ventricular function in Chagas disease. *Mem. Ins Oswaldo Cruz.* 113, 1–8.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 3666–3670.
- Sedger, L.M., McDermott, M.F., 2014. TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 453–472.
- Jang, D.-I., Lee, A.-H., Shin, H.-Y., Song, H.-R., Park, J.-H., Kang, T.-B., Lee, S.-R., Yang, S.-H., 2021. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>.
- Issuree, P.D., Maretzky, T., McIlwain, D.R., et al., 2013. IRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* 25, 1–5. Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H., McDermott, M.F., et al., 2019. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res* 8, 1–12.

- Ahmad, S., Azid, N.A., Boer, J.C., Lim, J., Chen, X., Plebanski, M., et al., 2018. The key role of TNF-TNFR2 interactions in the modulation of allergic inflammation: a review. *Front. Immunol.* 9 (2572), 1–10.
- Kroll-palhares, K., Silv'erio, J.C., Da silva, A.A., et al., 2008. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF- α blockade. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 375–385.
- Villar, S.R., Ronco, M.T., Bussy, R.F., et al., 2013. Tumor necrosis factor- α regulates glucocorticoid synthesis in the adrenal glands of *Trypanosoma cruzi* acutely-infected mice. The role of TNF-R1. *PLoS ONE* 8, 1–13.
- Truyens, C., Torrico, F., Lucas, R., De Baetselier, P., Buurman, W.A., Carlier, Y., 1999. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 67, 5579–6558.
- Van Zee, K.J., Kohno, T., Fischer, E., Rock, C.S., Moldawer, L.L., Lowry, S.F., 1992. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *PNAS* 89, 4845–4849.
- Arias, J., Valero, N., Mosquera, J., et al., 2014. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology* 452–453, 42–51.
- Kim, H.L., Lee, J.P., An, J.N., et al., 2016. Soluble tumor necrosis factor receptors and arterial stiffness in patients with coronary atherosclerosis. *Am. J. Hypertens.* 1–6.
- Bessa, T.F., Cordeiro, C.A., Gonçalves, R.M., et al., 2012. Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor-2 (sTNFR2) in patients with active toxoplasmic retinochoroiditis. *Braz J Infect Dis* 16, 540–544.
- Rostami, M.N., Jasbi, E.S., Khamesipour, A., Mohammadi, A.M., 2016. Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and its soluble receptor type 1 (sTNFR I) in human active and healed leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 38, 255–260.
- Silva, H.T., Costa, H.S., Lima, V.P., et al., 2020. Plasma levels of soluble TNF receptors are associated with cardiac function in patients with Chagas heart disease. *Int. J. Cardiol.* 316, 101–103.
- García, M.M., Derissio, A.M., Villalonga, X., Mengoni, E., Cardon, L.R., 2008. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors (sTNF-R1 and -R2) in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and their children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 499–503.
- González, F., Villar, S., D'Attilio, et al., 2018. Dysregulated network of immune, endocrine and metabolic markers is associated to more severe human chronic chagas cardiomyopathy. *NeuroImmunoModulation* 25, 119–128.

Mocelin, A.O., Issa, V.S., Bacal, F., Guimarães, G.V., Cunha, E., Bochi, E.A., 2005. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* 7, 869–873.

Aliberti, J.C.S., Souto, J.T., Marino, A.P.M.P., et al., 2001. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ - and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 158, 1433–1440.

Dutra, W.O., Menezes, C.A.S., Magalhaes, L.M.D., 2014. GOLLOB KJ immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 36, 377–387.

Gómez-Olarte, S., Bolaños, N.I., Echeverry, M., Rodríguez, A.N., Cuéllar, A., Puerta, C.J., et al., 2019. Intermediate monocytes and cytokine production associated with severe forms of Chagas disease. *Front. Immunol.* 10, 1671.

Vasconcelos, R.H.T., Azevedo, E.A.N., Diniz, G.T.N., Cavalcanti, M.G.A.M., Oliveira, W., Morais, C.N.L., et al., 2015. Interleukin-10 and tumor necrosis factor- α serum levels in chronic Chagas disease patients. *Parasite Immunol.* 37 (7), 376–379.

Cai, C.W., Blase, J.R., Zhang, X., Eickhoff, C.S., Hoft, D.F., et al., 2016. Th17 Cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 12 (10), e1005902.

Joyce, D.A., Gibbons, D.P., Green, P., Steer, J.H., Feldmann, M., Brennan, F.M., 1994. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur. J. Immunol.* 24, 2699–2705.

6.2 Artigo 2: Adalimumab e Etanercept isolados ou associados com Benzonidazol impactam na produção de citocinas do perfil Th1 e Th2 em células mononucleares de portadores de doença de Chagas crônica. **Revista:** *Parasite Immunology*

09/07/2023, 13:11

E-mail de Universidade Federal de Pernambuco - Manuscript submitted - PIM-2023-0073



DIEGO JOSE LIRA TORRES <diego.ltorres@ufpe.br>

Manuscript submitted - PIM-2023-0073

1 mensagem

Apeksha Pradhan <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

7 de julho de 2023 às 22:45

Responder a: PIMedoffice@wiley.com

Para: virginia.lorena@fiocruz.br

Cc: virginia.lorena@fiocruz.br, diego.ltorres@ufpe.br, kamila.kassia@ufpe.br, msb.michelle@gmail.com, leyllane.moreira@ufpe.br, luffne@gmail.com, albuquerquepedade@gmail.com, gloriamelo.gm@gmail.com, s.m.martins@uol.com.br, woliveirajr@uol.com.br, michelle.rabello@fiocruz.br

Dear Dr Lorena

Your manuscript entitled "Adalimumab and Etanercept alone or associated with Benznidazole impact the production of cytokines of the Th1 and Th2" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in *Parasite Immunology*. Your paper will now be checked by the Editorial Office to ensure it is ready to go to an Editor. If there are any changes required, your manuscript will be returned to you and you will receive instructions by email of what changes to make. If there are no changes required, your manuscript will be assigned to an Editor for initial assessment. If your submission passes these stages it will be sent for peer review.

Your manuscript ID is PIM-2023-0073.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence.

Our journal is currently transitioning to Wiley's Research Exchange submission portal.

If you submitted this manuscript through our Research Exchange site, you can view the status of your manuscript by logging into the submission site at

wiley.atyponrex.com/journal/PIM.

If you submitted this manuscript through ScholarOne, you can view the status of your manuscript by checking your Author Center after logging in to

<https://mc.manuscriptcentral.com/pim>.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript. Otherwise, no further action is required on your part.

This journal offers a number of license options for published papers; information about this is available here: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html>. The submitting author has confirmed that all co-authors have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. If any author's funder has a policy that restricts which kinds of license they can sign, for example if the funder is a member of Coalition S, please make sure the submitting author is aware.

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Thank you for submitting your manuscript to *Parasite Immunology*.

Sincerely,

PIM Editorial Office

RESUMO

Estudos envolvendo a resposta imunológica na doença de Chagas sugerem um desequilíbrio na resposta imune dos portadores crônicos, com predomínio de perfil inflamatório na cardiopatia chagásica, principalmente pelo TNF. Considerada uma citocina chave na imunopatologia em portadores crônicos, o TNF está envolvido em vários processos durante a resposta imune. O nosso trabalho teve como objetivo avaliar citocinas do perfil regulatório (IL-4 e IL-10) e inflamatório (TNF, IFN- γ , IL-2 e IL-6) em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes crônicos apresentando as formas clínicas indeterminada - IND (n=13) cardíaca leve - CARD1 (n=13) e cardíaca grave - CARD2 (n=16), tratadas *in vitro* com dois bloqueadores de TNF, Adalimumabe (ADA) e Etanercepte (ETA) isolados ou em associação com Benzonidazol (Bz). Os resultados apontam que o ADA foi mais competente em bloquear TNF (comparado ao ETA), em todos os grupos, mas com seus níveis muito mais reduzidos no grupo CARD 2. ETA diminuiu os níveis de TNF de forma estatística apenas no grupo CARD 2. IFN aumentou no grupo CARD 2 após tratamento com ETA em relação ao ADA. IL-4 teve seus níveis diminuídos quando tratados por ambas as drogas. IL-2 diminuiu em células de portadores CARD 2 quando comparado ao grupo NEG após tratamento por ambas as drogas. A associação com o Benzonidazol diminuiu níveis de IL-2/TNF e aumentou IL-4. Esses dados reforçam a participação do TNF na cardiopatia grave e traz perspectivas no uso desses bloqueadores no tratamento imunológico da doença de Chagas, já que o uso do Benzonidazol é extremamente limitado nesses pacientes.

Palavras-chave: Citocinas. Doença de chagas crônica. Inibidores do Fator de Necrose Tumoral. Benzonidazol. Cardiomiopatia Chagásica. Leucócitos Mononucleares. Fator de Necrose Tumoral-alfa

1 | INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afetando aproximadamente de 6 a 7 milhões de pessoas ao redor do mundo.¹⁻² Estima-se que 70 milhões de pessoas estejam sob risco de infecção, uma vez que cada vez mais a infecção vem sendo detectada em outros países e continentes devido aos movimentos migratórios.³⁻⁴ Tem ampla prevalência entre populações pobres da América Latina com distribuição em mais de 21 países causando mais de 10.000 mortes anuais.¹⁻² No Brasil, a forma de transmissão pela via oral, é a principal via de contaminação e tem levado a importantes surtos agudos, necessitando de medidas sanitárias urgentes. Assim, mesmo após todos os esforços para controlar a transmissão vetorial e sanguínea, a doença de Chagas permanece um grave problema de saúde pública.^{2,5}

A infecção culmina em uma fase aguda que cursa com parasitemia intensa com duração de cerca de 60 dias em que os sintomas são leves, inespecíficos ou ausentes. A forma crônica é caracterizada por formas clínicas que variam entre portadores assintomáticos (forma indeterminada) a manifestações graves com consequências neurológicas (forma nervosa), cardíacas (forma cardíaca) e digestivas (forma digestiva).^{1,3,4}

A forma indeterminada ou assintomática é responsável pela maioria dos casos, (cerca de 70%), onde o portador tem as mesmas expectativas de vida de uma pessoa sem a doença. Em contrapartida, a forma cardíaca ou cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a manifestação crônica mais grave e responsável pela alta mortalidade na doença, acometendo cerca de 30% dos indivíduos. Devido à persistência do parasita (em órgãos como o coração) na fase crônica, uma resposta imune celular é montada levando a um intenso dano tecidual sem reparos.^{3,4,6}

Ainda há muito o que se entender sobre como os portadores crônicos evoluem para formas clínicas graves da doença, como a CCC ou saem de formas assintomáticas e passam a desenvolver sintomas. Acredita-se que a resposta imunológica tenha uma importante contribuição, seja para prevenir ou atenuar, mas também para acelerar esse processo.⁷⁻⁸

O *Trypanosoma cruzi* interage com as diferentes respostas imunes: inata e adaptativa do hospedeiro de uma maneira muito complexa. Ainda que a resposta proliferativa das células T circulantes em portadores crônicos seja prejudicada,

essas células são produtoras de citocinas pró e anti-inflamatórias e responsáveis pela baixa parasitemia durante essa fase.⁷⁻⁹

A variedade de diferentes perfis de linfócitos Th é definida pelas citocinas que produzem e a natureza antigênica.⁹⁻¹⁰ Na doença de chagas há um predomínio do perfil Th1, estando relacionado com controle e/ou eliminação parasitário, mas também participação na inflamação, sobretudo na forma cardíaca, onde esses mecanismos são mais bem elucidados.¹⁰⁻¹³

As citocinas produzidas pelos linfócitos regulam a resposta imune e são implicadas tanto na resistência à infecção quanto na evolução clínica dos portadores da doença de Chagas.^{10,14} As análises dos perfis de citocinas pró e anti-inflamatório sugerem que a IL-10 está mais elevada em indivíduos com a forma indeterminada quando comparada aos da forma cardíaca. Em contrapartida, citocinas pró-inflamatórias, como o interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF) estão em níveis mais elevados em portadores da forma cardíaca e possivelmente, representam piora da função cardíaca.¹⁴⁻¹⁹

De todas as citocinas, o TNF é o mais explorado, ainda que alguns estudos trazem seu papel um pouco controverso, entre aumento em portadores crônicos ou níveis baixos ou indetectáveis em outros. Esta citocina se liga a seus receptores, TNFR1 e TNFR2, que também participam na imunopatologia estando associado ao dano cardíaco ou a regulação.²⁰⁻²¹

Entender os mecanismos imunológicos envolvidos nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas podem contribuir na busca de biomarcadores imunes, bem como servir de alvos terapêuticos, já que citocinas como o TNF contribuem com o processo inflamatório da infecção. Dessa forma, nosso objetivo foi o estudo das citocinas do perfil Th1/Th2 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico de portadores com diferentes formas clínicas da doença de Chagas tratadas com dois biológicos anti-TNF, Adalimumab e Etanercept isolados ou associados com o Benzonidazol, droga de escolha para o tratamento etiológico no Brasil.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1| População de estudo

Foram selecionados 42 portadores crônicos da doença de Chagas atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. Para inclusão no estudo, os pacientes atenderam alguns critérios, como: ter realizado exames clínicos (eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago) para a classificação da forma clínica, sorologia reagente para a infecção chagásica, segundo o Ministério da Saúde (2005), não ter sido submetido ao tratamento etiológico ou que tenham recebido o tratamento há no mínimo 3 a 5 anos, além de não possuírem marcapasso, doenças infecto parasitárias, e doenças metabólicas.

A classificação clínica foi realizada seguindo o II Consenso em doença de Chagas e pela I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica.⁶ Desta forma, foram estabelecidos os grupos de pacientes: Forma indeterminada (IND) (n=13), sem sintomas cardíacos, com eletrocardiograma (ECG) e ecocardiograma (ECO) normais; Forma cardíaca leve (CARD 1) (n=13), 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); Forma cardíaca grave (CARD 2) (n=16) com disfunção ventricular e sintomas atuais ou anteriores de insuficiência cardíaca congestiva.

Os grupos controles foram divididos em dois: não infectados (NEG) constituído por 12 indivíduos, onde não poderiam ter habitado em área endêmica para a doença de Chagas; nunca ter recebido transfusão de sangue e ter apresentado teste sorológico não reagente. E um grupo constituído por portadores de cardiopatia não chagásica, sem definição da causa de base, sendo, portanto, classificados como portadores de cardiopatia idiopática-IDIOP (n=12). É importante salientar que este último grupo apresenta percentual de Fração de Ejeção Ventricular Esquerdo -%FEVE (medida importante de dano cardíaco), semelhante aos pacientes do grupo CARD2 (Tabela 1).

Tabela I: Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais da população de estudo

Variáveis	NEG	IDIOP	IND	CARD 1	CARD 2
Número de pacientes	12	12	13	13	16
Idade (anos)	52 ± 7.37	56.4 ± 10.32	53 ± 13.7	57 ± 12.83	58.7 ± 13.08
Sexo					
Masculino	2 (16.66%)	7(58.33%)	3 (23.08%)	3 (23.08%)	9 (56.25%)
Feminino	10 (83,34%)	5 (41.66%)	10 (76.92%)	10 (76.92%)	7 (43.75%)
Altura (Metros)	-	1.65 ± 0.9	1.60 ± 0.09	1.57 ± 0.10	1.61 ± 0.08
Peso (Kg)	-	71±13.9	75.23±13.4	66.3±9.59	69.8±16.9
IMC (kg/m²)	-	26.24±5.92	29.4±4.30	27.04±3.87	26.67±5.76
Região (Pernambuco)					
Sertão	1 (8.33%)	-	3 (23.07%)	4 (30.76%)	1 (6.25%)
Agreste	-	1 (8.33%)	3 (23.07%)	2 (15.38%)	2 (12.5%)
Mata	-	4(33.33%)	2 (15.38%)	3 (23.07%)	5 (31.25%)
Metropolitana	11 (91.6%)	7(58.33%)	5 (38.46%)	3 (23.07%)	8 (50%)
Outros estados	-	-	-	1 (7.69%)	-
Ecocardiograma					
FEVE (%)	-	38.35 ± 16.13	64.7 ± 4.8	64.2 ± 4.23	33.44 ± 9.87
Ventrículo direito (mm)	-	32.5±5.5	31.63±5.07	31.09±5.58	35.86±7.8
Volume diastólico final (mL)	-	181.9 (70-405)	112 (112 -135)	112 (83.06 – 135)	209 (129-280)
Volume sistólico final (mL)	-	111 (22-282)	37.9 (35 -54.43)	36 (29.55 – 47.43)	146(83-208)
Massa do ventrículo esquerdo (g)	-	224 (141-380)	120 (141 – 141)	123 (87 – 168.32)	212(115-303)
Índice da Massa do VE (g/m) ²	-	126.4±16.17	72.75±19.66	80.96±23.54	126±39.5
Testes Laboratoriais					
Colesterol	-	199.22±24	216.24±36	199.97±38	182.56±42
Triglicerídeos	-	102.5±24	151.51±59	171.32±111	122.43±37
Glicose	-	102.8±25	109.7±41	104.7±17	99.6±10

IMC: Índice de massa corporal. NEG: Negativo, IDIOP: Cardiopatia idiopática. IND: forma indeterminada; CARD 1: forma cardíaca leve; CARD 2: forma cardíaca grave. FEVE: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo. IND: Colesterol Total (n=12), Triglicerídeos (n=12) e Glicose (n=12). CARD1: Colesterol Total (n=12), Triglicerídeos (n=12) e Glicose (n=11). CARD2: Colesterol Total (n=11), Triglicerídeos (n=11) e Glicose (n=11) e IDIOP: Colesterol Total (n=09), Triglicerídeos (n=08) e Glicose (n=10). Resultados apresentados como frequência, média e interquartil. **, P < 0,0001, CARD 2 vs IND (teste de Mann-Whitney).

2.2 | Confirmação da sorologia para a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Após a retração do coágulo, os tubos foram centrifugados (900 x g/ 10 minutos em temperatura ambiente) e alíquotas de soro devidamente identificadas e armazenadas a -20°C na soroteca do Serviço de Referência em Doença de Chagas

(SRDC) do Laboratório de Imunoparasitologia do IAM. Um imunoenensaio enzimático composto por uma mistura de extratos totais de *T. cruzi* adsorvidos à placa de microtitulação (Chagastest ELISA lisado) e um imunoenensaio enzimático utilizando antígenos recombinantes adsorvidos à placa de microtitulação (Chagastest ELISA recombinante v. 4.0), ambos de Wiener lab foram usados. Foram considerados resultados reativos quando ambos os testes mostraram reatividade e não reagentes quando ambos os testes não mostraram reatividade, de acordo com o II Consenso Brasileiro sobre Doença de Chagas⁶

2.3 | Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

Nove mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo heparina sódica para realização da cultura celular. O sangue heparinizado foi misturado a PBS pH 7,2 na proporção de 1:2 e adicionado a tubos falcon 50mL contendo Ficoll-hypaque (1 parte de Ficoll-Paque e 3 da mistura sangue-PBS). Em seguida, os tubos foram submetidos a uma centrifugação (900 x g/ 40 min a 20° C) e o anel de PBMC coletado e depositado em tubos falcon de 15mL. Monócitos e Linfócitos foram lavados 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 (1:10) e ajustadas para a concentração de 1×10^6 células por poço.

2.4 | Tratamento de cultura celular com drogas imunossupressoras

As PBMC foram depositadas em placas de 48 poços contendo meio RPMI 1640 suplementado, tendo volume final de 1mL. As condições de cultivo foram seis: células sem inibidores/tratamento (C), células tratadas isoladamente com duas drogas anti-TNF: Humira® (Adalimumab, ADA: 5µg/mL) e Enbrel® (Etanercepte (ETA: 10 µg/mL), Benzonidazol (BZ: 1µg/mL) e em associação Adalimumab + Benzonidazol (A+BZ), Etanercepte + Benzonidazol (E+BZ) (para o ajuste final das drogas em associação o cálculo foi realizado numa concentração de 4x). A placa foi incubada em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C num período de 48h.

6.7 | Quantificação de citocinas do perfil Th1 e Th2 em sobrenadantes de cultura

Após 48h de cultura, os sobrenadantes foram coletados e estocados para dosagem das citocinas TNF, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-4 e IL-2. Primeiramente, 25 μ L da mistura de *beads* de captura, marcadas com anticorpos monoclonais foram transferidas para tubos de poliestireno (5mL) (BD Systems™) devidamente identificados. Em seguida, 25 μ L das amostras (sobrenadante) foram adicionados por 3h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente foram adicionados 25 μ L do reagente de detecção contendo anticorpos anti-citocinas alvos conjugadas à *Phycoerythrin* (PE) por 2h à Temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as *beads* foram lavadas e 300 μ L de solução tampão adicionados para ressuspensão das esferas. A aquisição foi realizada dentro de 24h utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (Beckton Dickson) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As análises foram realizadas através do *Software* FCAP Array versão 3.01 (Beckton Dickson).

2.6 | Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do software PRISM 8.0.2 Windows® (USA). A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de medidas descritivas como: média, mediana e desvio padrão. Inicialmente foi aplicado um teste de normalidade Shapiro-Wilk onde foi verificado que os dados eram não paramétricos, com exceção da IL-6. Para comparação das medianas das citocinas em grupos diferentes foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de comparações múltiplas de Dunn. Já para a comparação das condições de cultivo dentro do mesmo grupo de pacientes foi aplicado o teste de Friedman. A avaliação das correlações foi realizada através do teste de correlação não-paramétrica de Spearman. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

2.7 | Considerações éticas

Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE) e todas as abordagens utilizadas foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães/IAM, Fiocruz Pernambuco (CAAE 20049919.5.0000.5190).

3 | RESULTADOS

3.1| Aumento do TNF e diminuição de IL-4 em portadores de doença de chagas na forma grave

Inicialmente foi realizada uma análise individual somente nos poços sem estímulo, ou seja, apenas células (PBMC's) com o intuito de avaliar a produção das citocinas do perfil pró e anti-inflamatório em cada grupo do estudo. Das citocinas analisadas, não houve nenhuma diferença estatística (Fig 1A, B, E e F), com exceção do TNF (Fig 1C) e IL-4 (Fig 1D).

TNF aumentou no sobrenadante proveniente de células de portadores com cardiopatia chagásica crônica na forma grave (C) quando comparado ao grupo saudável, (NEG) (p:0.0096). Entre os grupos de portadores de chagas (IND, CARD1 e CARD2), houve um aumento de TNF no grupo com a forma mais grave (CARD2) quando comparado ao grupo com a forma cardíaca leve (CARD1) (p:0.0005). (Fig 1C). Houve diminuição, também na produção da IL-4 em portadores de cardiopatia chagásica na forma grave (CARD2) quando comparada aos portadores de cardiopatia não chagásica (IDIOP) (p:0.0223).

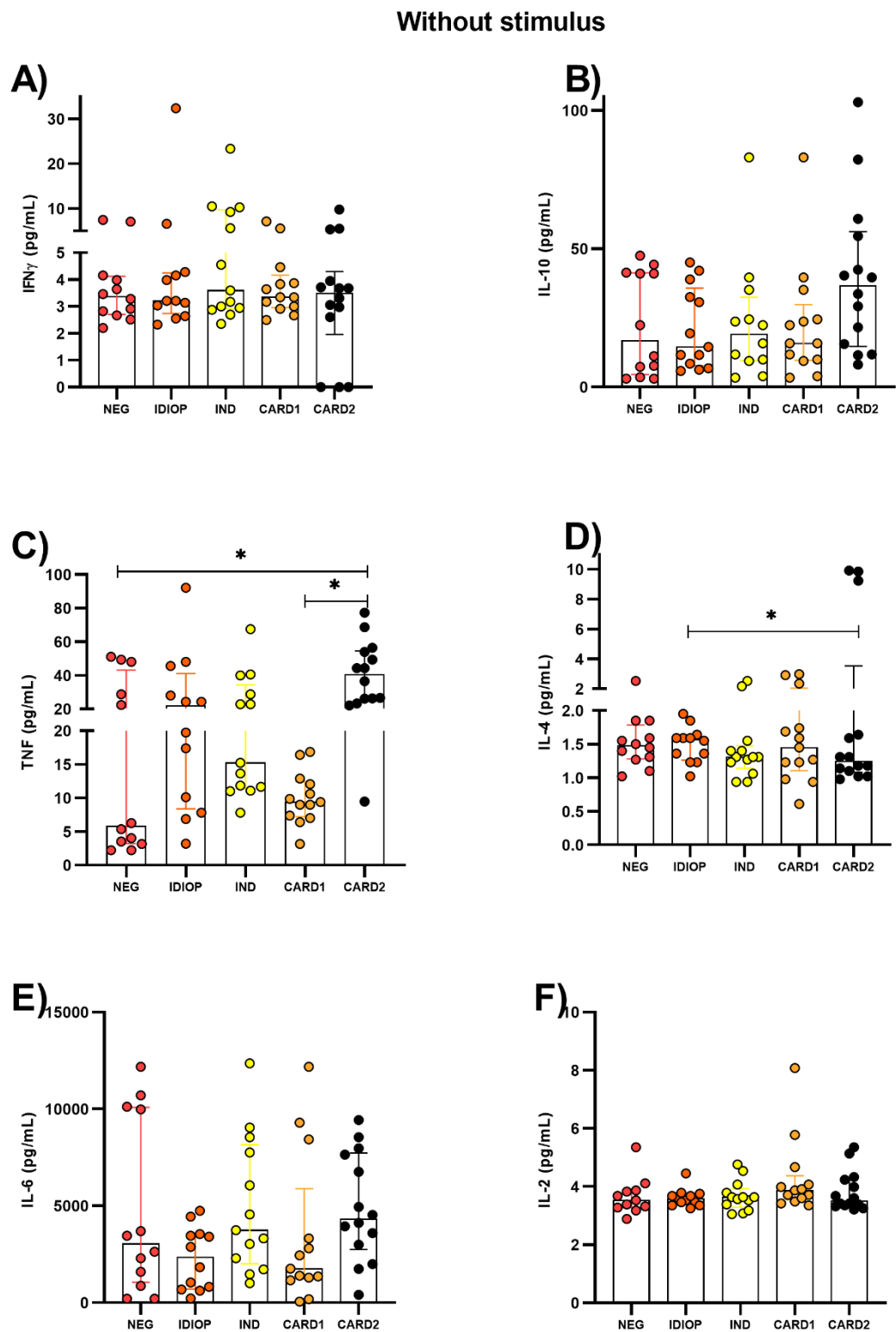


Figura 1. Alteração nos níveis de TNF e IL-4 em sobrenadantes de cultura sem estímulo (C) de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes saudáveis (NEG) e com doença de Chagas (IND, CARD1 e CARD2) e cardiopatia idiopática (IDIOP). As linhas representam a mediana de cada grupo e as diferenças estatísticas são indicadas por barras representadas por *: $P < 0,05$ e **: $P < 0,0001$

3.2 | Adalimumab e Etanercepte diminuem drasticamente níveis de TNF em portadores de cardiopatia chagásica grave.

Na figura 2A, podemos observar a eficácia dos bloqueadores de TNF (ADA e ETA) quando comparados aos poços somente com células (C) para cada grupo de paciente (NEG, IDIOP e chagásicos). A produção do TNF foi diminuída na adição do bloqueador ADA (Fig. 2a). O adalimumab diminuiu de forma significativa, os níveis de TNF em todos os grupos quando comparado ao grupo sem estímulo (C).

Ao comparar a eficácia das duas drogas em inibir o TNF, podemos verificar que o ADA diminuiu muito mais que o ETA. Visualmente os níveis do TNF diminuíram na adição das duas drogas: porém diferentemente do ADA, onde diminuiu de maneira estatisticamente significativa em todos os grupos, os níveis de TNF só foram diminuídos de maneira significativa apenas no grupo dos portadores chagásicos na forma cardíaca grave (CARD 2) quando utilizou o estímulo ETA quando comparado a condição sem estímulo (C) ($p:0.0245$) (Fig. 2a).

Ao analisarmos isoladamente a condição ADA por grupo (Fig. 2b), podemos verificar a diminuição do TNF no grupo com cardiopatia grave quando comparado ao grupo NEG ($p<0.0001$) IDIOP ($p:0.0019$) e IND ($p:0.0002$). Como demonstrado na figura 2c, os níveis de TNF em células de portadores de cardiopatia chagásica grave foram totalmente reduzidos com a utilização desta droga.

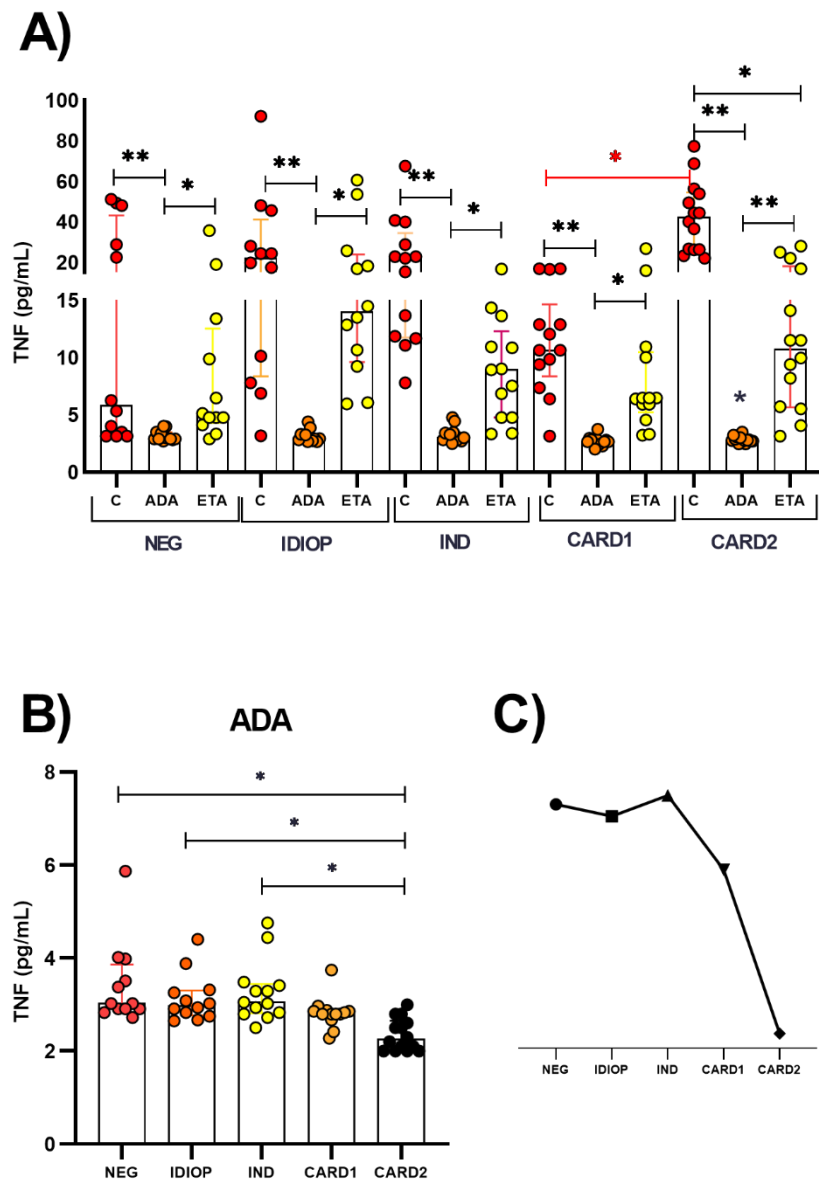


Figura 2. Redução drástica dos níveis de TNF em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de portadores crônicos da doença de Chagas (IND, CARD1 e CARD2), saudáveis (NEG) e cardiopatas idiopáticos (IDIOP) tratados com Adalimumabe (ADA: 5µg/mL) e Etanercepte (ETA: 10 µg/mL) (A e B). Curva de produção dos níveis de TNF após bloqueio do ADA (C). As linhas representam a mediana de cada grupo e as diferenças estatísticas são indicadas pelas barras representadas por *: $P < 0,05$ e **: $P < 0,0001$. 2B: NEG vs CARD2: $p < 0,0001$; IDIOP vs CARD2: $p: 0,0019$; IND vs CARD2: $p: 0,0002$

3.3 | Adalimumab e Etanercepte não afetam IL-6, mas impactam positivamente e negativamente na produção das outras citocinas do perfil Th1 e Th2

ADA e ETA não só impactam significativamente a produção de TNF, mas também de todas as outras citocinas do perfil Th1 e Th2, com exceção da IL-6. (Fig. 3c). Ao analisar a produção de IFN- γ (Fig. 3a), verificamos um aumento desta citocina, após adição do ETA, quando comparado a condição sem células (C) (no grupo sem a doença) (p: 0.04). Foi verificado um aumento de INF- γ no grupo de cardiopatia chagásica crônica grave (CARD 2) na condição do uso de ETA quando comparado ao ADA (p: 0.02).

Ao analisar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Fig. 3b), entre os estímulos, verificamos uma diminuição após adição do ADA (p:0.0128), nos grupos Neg e nos portadores crônicos de chagas na forma indeterminada (IND) (p: 0.001) e forma grave (CARD 2) (p:0.0003), quando comparados a condição sem estímulo (C). Diferentemente do TNF, a IL-4 foi impactada negativamente quando adicionadas ambas as drogas (ADA e ETA) em relação a condição sem estímulo, somente célula (C), em todos os grupos, com exceção do grupo IDIOP, onde apenas o ETA diminuiu seus níveis significativamente (p:0.032). Os níveis de IL-4 diminuíram na presença de ADA e ETA quando comparado ao poço sem estímulo (Fig. 3d).

Etanercepte aumenta níveis de IL-2 no grupo NEG (p:0.003) e IDIOP (0.008) quando comparado a condição sem estímulo (Fig. 3E). Ao comparar a ação das drogas por grupo na produção da IL-2, observamos uma diminuição desta citocina na condição que recebeu ADA no grupo CARD2 quando comparado grupo NEG (p: 0.009) (Fig. 3F). A IL-2 também diminuiu na presença do ETA em células provenientes de portadores CARD 2 quando comparado aos NEG (p:0.013) (Fig. 3G).

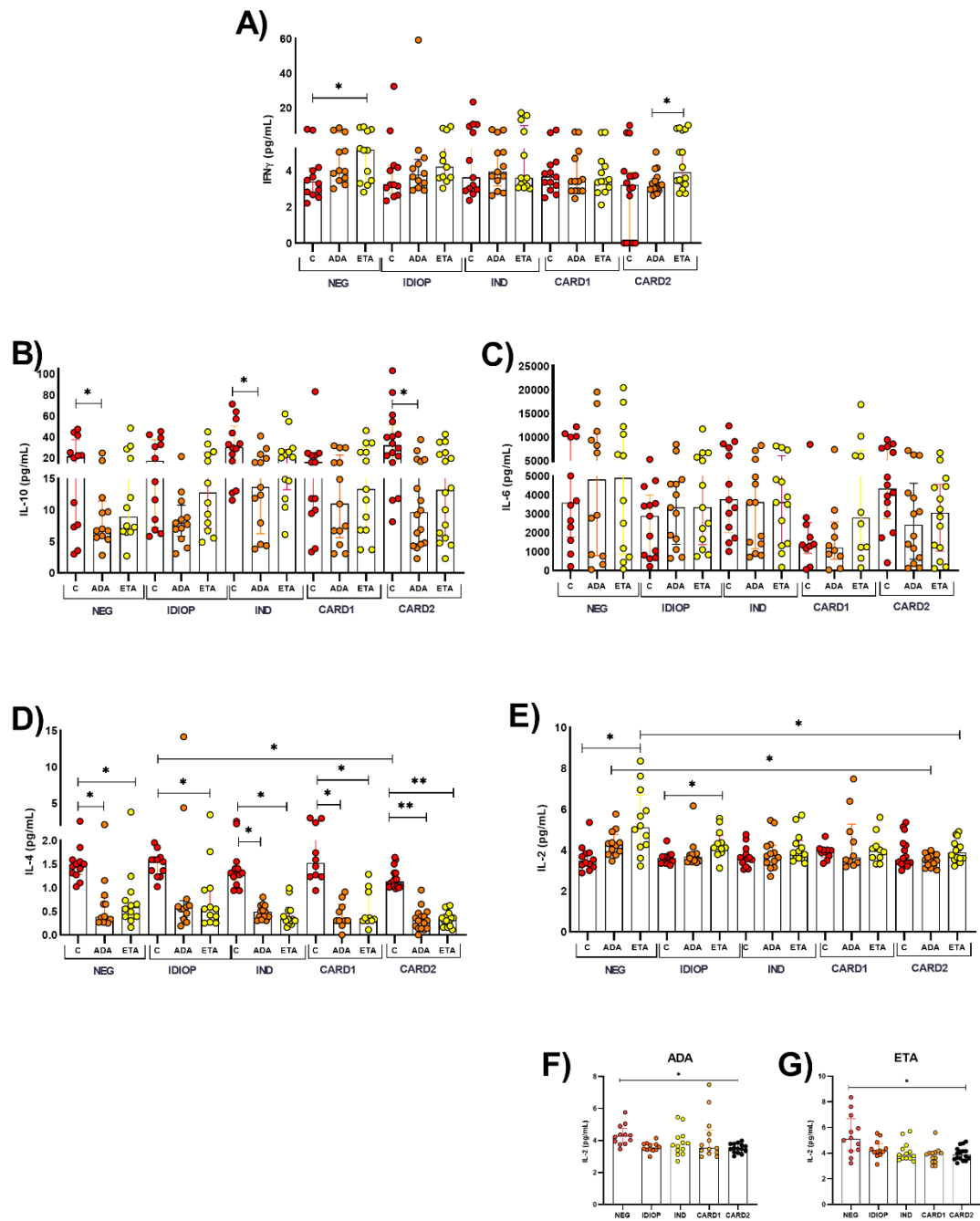


Figura 3. Alteração nos níveis de outras citocinas do perfil pró-inflamatório Th1 (IFN- γ e IL-2) e anti-inflamatório Th2 (IL-4 e IL-10) em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de portadores de doença de Chagas (IND, CARD1 e CARD2), saudáveis (NEG) e cardiopatas idiopáticos (IDIOP) tratados com Adalimumabe (ADA: 5 μ g/mL) e Etanercepte (ETA: 10 μ g/mL). Comparação por condição de cultivo (A,B,C,D e E). Mediana dos grupos tratados com ADA (F) e ETA (G). As linhas representam a mediana de cada grupo e as diferenças estatísticas são indicadas pelas barras representadas por *: P < 0,05 e **: P < 0,0001.

3.4 | Associação dos bloqueadores de TNF com o benzonidazol.

Na figura 4, verificamos os resultados da associação dos bloqueadores de TNF (ADA e ETA) + Benzonidazol (BZ): (A+BZ, E+BZ). Na produção de TNF, foi possível observar que a associação A+BZ diminuiu seus níveis quando comparado ao poço que recebeu somente BZ no grupo NEG ($p:0.012$). No grupo IDIOP, os níveis de TNF diminuíram na condição experimental A+BZ quando comparado ao sem estímulo (C), ao BZ e E+BZ. ($p: 0.002$; $p: 0.005$; $p:0.005$, respectivamente). (Fig. 4A)

Na forma IND, os níveis de TNF foram impactados negativamente na associação A+BZ quando comparados ao C ($p<0.0001$), BZ ($p:0.04$) e E+BZ ($p:0.04$), assim como o E+BZ quando comparado ao C ($p:0.029$). Na forma crônica CARD1, os níveis de TNF diminuíram na condição A+BZ quando comparado a condição sem estímulo C ($p:0.0004$). Já na forma grave (CARD 2), os níveis de TNF diminuíram nas condições BZ ($p:0.009$), A+BZ ($p<0.0001$) e E+BZ ($p:0.002$) quando comparados ao sem estímulo (C). Houve uma diminuição drástica em células provenientes desses portadores quando tratadas com A+BZ quando comparadas a BZ ($p:0.006$) e E+BZ ($p:0.024$) (Fig. 4A).

O uso do BZ em indivíduos saudáveis aumentou os níveis de IFN- γ quando comparado a condição sem estímulo (C) ($p:0.012$) e A+BZ ($p:0.020$). Já nos indivíduos com cardiopatia de origem idiopática (IDIOP), a utilização de E+BZ também aumentou esses níveis quando comparado ao poço sem estímulo ($p:0.030$). Já o tratamento com BZ diminuiu esta citocina em células provenientes de portadores com cardiopatia chagásica grave quando comparado ao BZ do grupo NEG ($p:0.0005$) (Fig. 4B).

A associação do BZ com drogas bloqueadoras de TNF não alterou significativamente níveis de IL-10 em portadores chagásicos crônicos com a forma leve (CARD1). Mas a combinação de A+BZ diminuiu níveis de IL-10 quando comparado ao poço sem estímulo (C) nos grupos NEG ($p:0.003$), IDIOP ($p:0.0008$), IND ($p:0.005$) e CARD2 ($p< 0.0001$). Além disso, no grupo CARD2, níveis de IL-10 também foram menores nas condições BZ ($p:0.04$) e E+BZ ($p: 0.03$) quando comparado ao C (Fig. 4C).

Para IL-6, o impacto foi mínimo, na condição que recebeu ETA+BZ os níveis dessa citocina foram menores quando comparados ao sem estímulo no grupo de portadores crônicos com a forma IND ($p:0.03$) (Fig. 4D). As células que foram tratadas com BZ diminuíram a produção de IL-4 em todos os grupos, com exceção do NEG quando comparados ao poço sem estímulo. Isoladamente, o grupo NEG, IND, CARD1 e CARD2, nas células que receberam A+BZ tiveram níveis diminuídos de IL-4 quando comparado ao poço C. O uso de BZ diminui a produção de IL-4 no grupo de portadores IND e CARD2 quando comparado ao grupo saudável (NEG) (Fig. 4E).

Já naquelas células que receberam o tratamento do E+BZ diminuíram a IL-4 em todos os grupos quando comparados com o poço sem tratamento. A associação de A+BZ aumentou nos portadores com CARD1 quando comparados aos IND (Fig. 4E).

O uso do BZ e das associações pareceu não alterar IL-2 intragrupos, mas sim entre grupos. O uso do BZ isolado, diminui esta citocina nos grupos de portadores CARD1 e CARD2 quando comparado ao grupo NEG. Já a associação entre A+BZ diminui também a produção da IL-2 nos grupos IND e CARD2 quando comparado ao poço que recebeu ETA+BZ do grupo NEG (FIG 4F).

Na Figura 5, verificamos alterações nas citocinas IL4, IL2 e TNF, onde a associação de A+BZ aumentou os níveis de IL-4 no grupo CARD1 quando comparado ao grupo IND e CARD2 (Fig. 5A). A+BZ diminuiu a produção de IL-2 no grupo CARD2 em comparação ao grupo NEG (Fig. 5B). Já TNF teve seus níveis aumentados em portadores IDIOP quando comparados aos CARD1 e NEG (Fig. 5C).

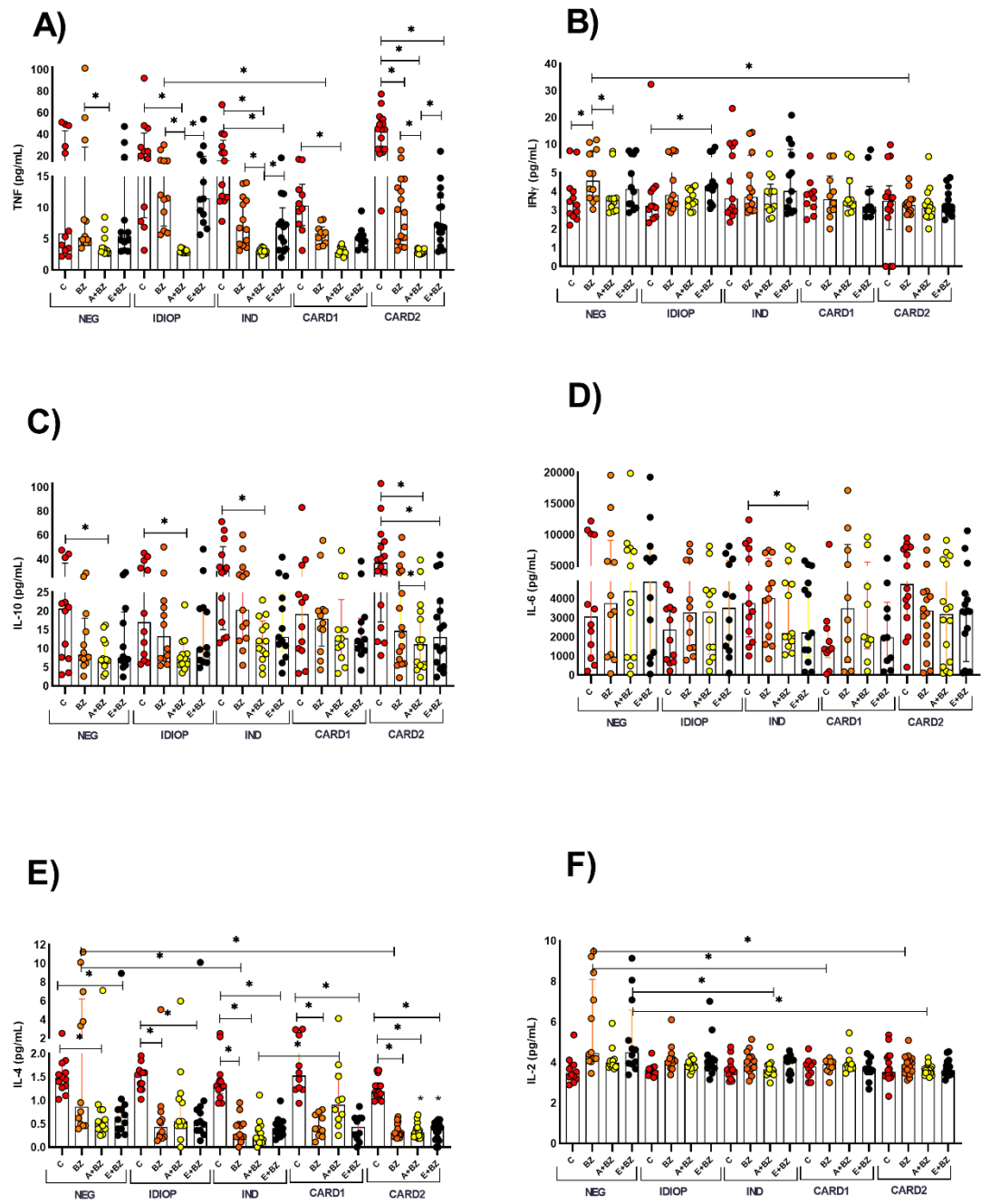


Figura 4. Impacto da associação dos bloqueadores de TNF, Adalimumabe e Etanercepte, com Benzonidazol nos níveis de citocinas do perfil Th1 e Th2 em diferentes condições de cultivo celular. C: apenas célula; BZ (Benznidazol: 1 μ g/mL); A+BZ (Adalimumabe (5 μ g/mL) + Benzonidazol); E+BZ (Etanercepte: 10 μ g/mL + Benzonidazol) as linhas representam a mediana de cada grupo e as diferenças estatísticas são indicadas pelas barras representadas por *: $P < 0,05$ e **: $P < 0,0001$

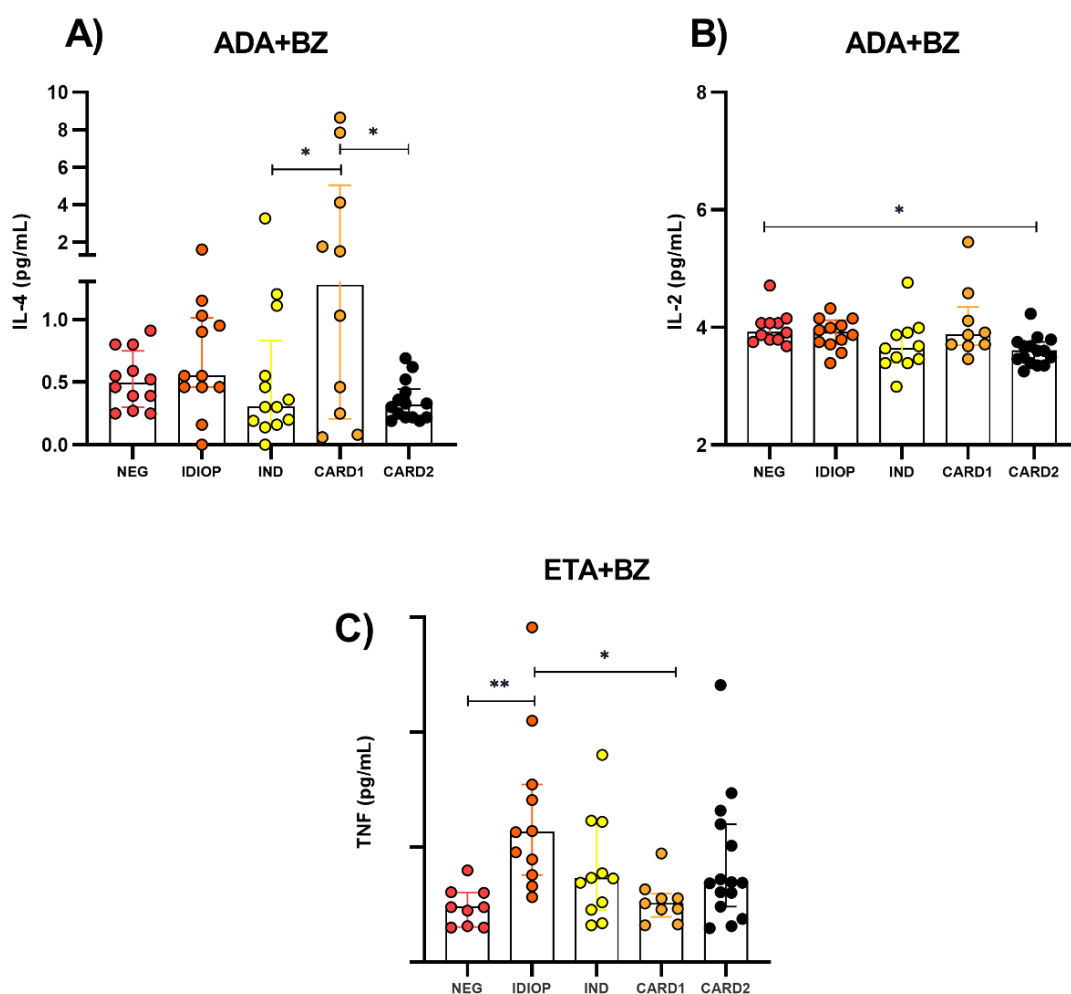


Figura 5. Predominância do perfil Th2 sobre Th1 após associação de bloqueadores de TNF e Benznidazol. Níveis aumentados de IL-4 em células de portadores de CARD1 (A) na condição de cultivo Adalimumabe + Benznidazol. Diminuição de IL-2 e TNF em CARD1 e CARD 2 (B e C), na condição de cultura tratada com Adalimumabe e Etanercepte associado a Benznidazol. As linhas representam a mediana de cada grupo e as diferenças estatísticas são indicadas pelas barras representadas por *: $P < 0,05$ e **: $P < 0,0001$.

3.5 | IL-4, após bloqueio com Etanercept, tem correlação positiva com a %FEVE em portadores de doença de Chagas grave

Ao correlacionar as citocinas do perfil Th1 e Th2 com as porcentagens da fração de ejeção ventricular esquerda, verificou-se uma correlação positiva e moderada (r : 0.61) no grupo com cardiopatia chagásica crônica grave. Isto é, à medida que aumenta IL-4, após a adição do Etanercepte, aumenta também a relação com a FEVE. Os outros estímulos permitiram uma correlação negativa sem estatística. Além disso, nenhuma outra citocina obteve resultados estatísticos.

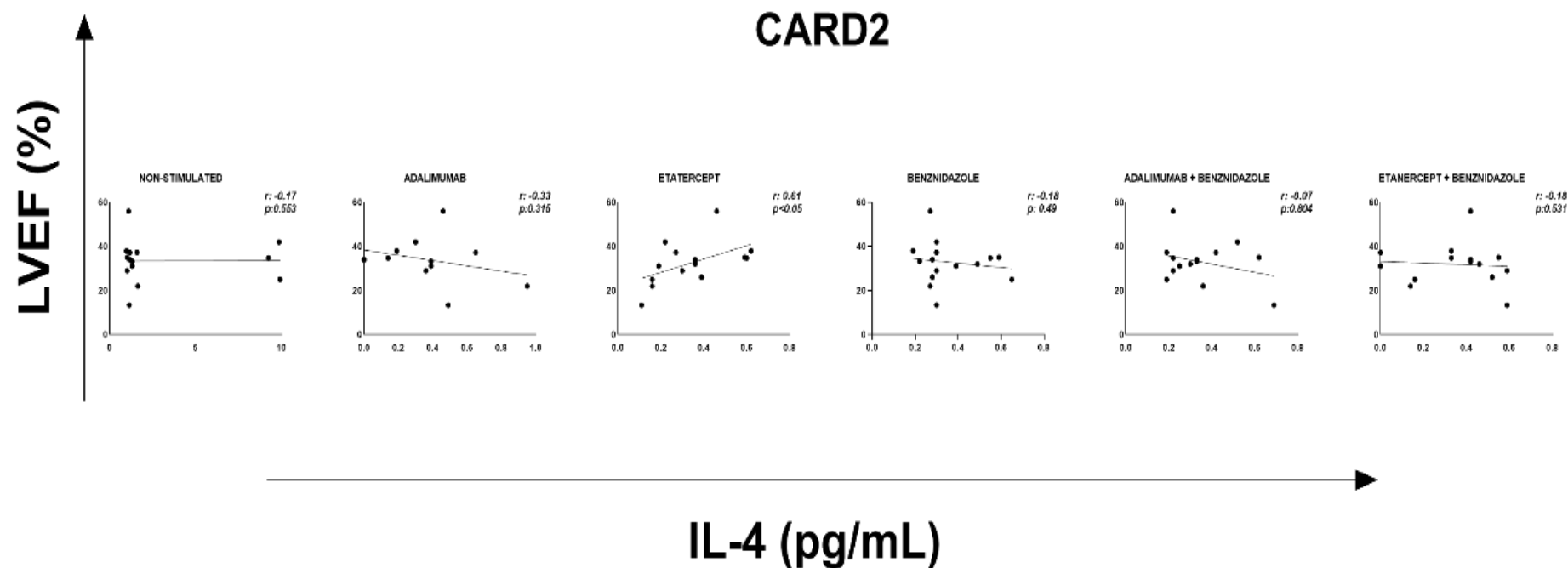


Figura 6. Correlação positiva e moderada entre o percentual de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (%FEVE) e IL-4 em pacientes com a forma CARD2 tratados com Etanercepte. R: Rank de Spearman

4 | Discussão e conclusão

Já é bem conhecido na literatura que portadores crônicos na forma indeterminada, possuem uma resposta imunológica mais regulada quando comparados aos portadores com acometimento cardíaco. Enquanto há um predomínio de citocinas anti-inflamatórias na forma IND, o comprometimento cardíaco é evidenciado com uma maior produção de citocinas pro-inflamatórias, sobretudo TNF.¹⁴⁻²³

Inicialmente, avaliamos a produção de citocinas entre os portadores, apenas na condição de cultivo que não recebeu nenhum estímulo (somente PBMC). Os nossos dados apontam aumento do TNF em portadores de cardiopatia chagásica grave (CARD 2) quando comparado ao grupo de cardiopatia chagásica leve (CARD 1) e NEG. O TNF é uma citocina pró-inflamatória e pleiotrópica, pois age em diferentes células, via receptores TNFR1 e TNFR2, sendo os macrófagos a principal fonte de produção.²⁴ Na doença de Chagas, o TNF tem participação chave na imunopatologia, pois seu aumento tem sido relacionado a gravidade da Cardiopatia Chagásica crônica. Assim, nossos resultados corroboram com estudos anteriores, em que níveis maiores de TNF estão presentes em indivíduos com cardiopatia grave tendo ainda correlação positiva com piora na função cardíaca^{15-17,19}. Nosso grupo dosou os níveis de TNF bem como de seus receptores solúveis, sTNFR1 e sTNFR2 no soro de 132 portadores crônicos, nesse estudo verificamos níveis baixos de TNF, mas elevação de seus receptores em portadores crônicos de doença de Chagas, sem diferenças entre as formas clínicas²⁰. É importante destacar a complexidade da resposta imune na doença, TNF desempenha um papel muito importante e podendo influenciar outros marcadores

Por outro lado, nossos dados evidenciam que PBMC de portadores com a forma CARD 2 produzem menores quantidades de IL-4 quando comparado a uma cardiopatia de origem não infecciosa (idiopática). O que demonstra que é o agente infeccioso, *Trypanosoma cruzi*, o gatilho nos níveis dessas citocinas, visto que o grupo de indivíduos IDIOP é clinicamente semelhante ao grupo CARD2, o que sugere que os pacientes com cardiopatia chagásica, possuem dano do tecido cardíaco induzido pela quebra da homeostasia imunológica e consequentemente

perda de mecanismos imunoregulatórios induzido pela presença do parasito nesse tecido.^{10,14-15}

A cardiopatia chagásica crônica tem sido relacionada com uma desregulação entre células Th1 e Th2, onde há um predomínio da produção de citocinas do perfil pró-inflamatório, sobretudo TNF e IFN- γ , por linfócitos TCD4+. TCD8+ e monócitos CD14+ e pelo tecido cardíaco, caracterizam a intensa inflamação e resposta Th1.^{19,22-23}

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória crucial na polarização do perfil Th2 sendo responsável pela proliferação de Linfócitos B e ativação de granulócitos, além da produção de colágeno por fibroblastos. Tem grande participação na antagonização da resposta inflamatória via Th1, juntamente com IL-13.²⁵ Na doença de Chagas, já foi visto que esta citocina mantém a inflamação e carga parasitária, em camundongos deficientes de IL-4.²⁶ Lorena et al (2010) verificaram uma diminuição na porcentagem de células TCD4+IL4+ em portadores de cardiopatia chagásica grave quando comparado a forma cardíaca leve e controles saudáveis, após estímulo com antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi*. É evidente o desequilíbrio imunológico nesses portadores.²⁷

Com o intuito de entender ainda mais a dinâmica do perfil de citocinas do perfil Th1 e Th2 na doença de chagas crônica, principalmente o TNF, que desempenha papel crucial na imunopatologia da doença, adicionamos dois bloqueadores de TNF, Adalimumab e Etanercept, na cultura de PBMC de portadores chagásicos, cardiopatia idiopática e saudáveis no período de 48h. Entender o perfil dessas citocinas na doença de Chagas podem servir como alvos imunoterapêuticos além de biomarcadores para a prevenção da evolução e controle na doença crônica.

14

Os inibidores de TNF estão entre as drogas de maior sucesso no tratamento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes como muitas artrites, sobretudo artrite reumatóide, espondilite anquilosante e doenças inflamatórias intestinais, além de muitos estudos de caso envolvendo esses biológicos e doenças parasitárias, como as Leishmanioses.^{24,28} Os efeitos dessas drogas imunomoduladoras no curso da doença de Chagas em humanos não são conhecidos.²⁹

Em nosso estudo, o uso do ADA, *in vitro*, induziu drasticamente a diminuição a produção de TNF pelas células mononucleares de todos os pacientes do estudo, tendo seu nível mais reduzido no grupo CARD 2 (Fig 2B, C). Por outro lado,

Etanercepte não inibiu de forma significativa os níveis de TNF em todos os grupos quando comparado a condição experimental sem tratamento, com exceção do grupo CARD 2. Dessa maneira, o ADA parece ser mais eficiente em inibir TNF do que o ETA, em todos os grupos, principalmente no grupo CARD 2. Esses resultados seguem uma lógica dentro desse estudo, uma vez que foram mensurados níveis maiores de TNF no grupo CARD 2 (na condição de cultivo sem estímulo).

O etanercept (Enbrel), foi o primeiro anti-TNF a ser aprovado, seguido pelo Adalimumab. Embora esses agentes biológicos atuem em comum, ligando-se de forma eficaz ao TNF e dessa forma impedindo a ligação com seus receptores TNFR1/TNFR2 são estruturalmente distintos, enquanto Etanercepte é a fusão entre os dímeros da porção extracelular do TNFR2 humano com a porção FC da IgG1 humana, Adalimumab é um anticorpo monoclonal totalmente humano.^{24,30}

As investigações clínicas mostraram vantagens do tratamento com Adalimumab em comparação com Etanercept e Infliximabe na questão de remissão de doenças inflamatórias e resposta terapêutica.³¹⁻³² Já foi demonstrado que o Alalimumab tem uma afinidade maior na ligação ao TNF quando comparado ao Etanercept e outros anti-TNF.³³⁻³⁴ O que poderia explicar essa diminuição maior de TNF nas células tratadas com o ADA quando comparados ao ETA.

Foram impactadas negativamente a produção de citocinas regulatórias IL-10 (por somente Adalimumab no grupo Neg, IND e CARD2) e IL-4 (ambos os inibidores, ADA e ETA, em todos os grupos) quando comparado a condição sem tratamento. Citocinas pró inflamatórias como IFN tiveram seus níveis aumentados após tratamento com ETA em comparação ao ADA no grupo CARD 2 e em relação ao poço sem estímulo no grupo NEG.

A produção de IL-2 foi menor em PBMCs de CARD2 tratadas com ADA e ETA quando comparado ao grupo NEG. Esta citocina leva a diferenciação e expansão de células T, aumento da atividade citotóxicas de células NK, indução da diferenciação de células Treg, além de mediar à morte celular induzida por ativação.³⁵

Nossos resultados mostraram que o ETA aumentou níveis de IFN em portadores de chagas crônicos e saudáveis. O que pode ser um ponto positivo na imunoterapia desses portadores no contexto de reativações de outras doenças, porém no âmbito do portador de chagas crônica, esse aumento de IFN- γ não seria benéfico dado o microambiente inflamatório que esses portadores apresentam a

nível de tecido cardíaco. Aliado a diminuição da IL-10 em portadores crônicos com a forma IND e CARD.

Wallis et al. (2007), verificaram que o uso de anti-TNF pode inibir a expressão de IFN- γ no sangue, e que essa inibição conjunta de citocinas inflamatórias poderia explicar o porquê de pneumonia e tuberculose serem efeitos adversos comuns em pacientes que fazem o uso desses inibidores, o que é um grande ponto negativo no uso desses biológicos anti-TNF. ³⁶

Já foi demonstrado o uso de inibidores de TNF em modelos experimentais com doença de chagas crônica. No estudo de Bilate et al., 2007, foi verificado que a ausência da sinalização do TNF (após bloqueio) e a infecção são importantes fatores aceleradores da insuficiência cardíaca, uma vez que a função ventricular e a FEVE foram diminuídas após o tratamento com Etanercept em hamsters infectados. O bloqueio do TNF não influenciou na intensidade de inflamação do miocárdio, porém levou a uma distribuição anormal das células, ficando estas, restritas a região subendocárdica. Essa anormalidade pode ser explicada na relação do TNF com o recrutamento de quimioquinas. ³⁷ Ainda de acordo com Bilate et al., (2007), a análise de citocinas no ventrículo esquerdo revelou o aumento de mRNA da IL-10 e diminuição de iNOS, sem nenhum impacto nos níveis de mRNA de TNF, IFN, TGF-B promotor de fibrose, peptídeo natriurético atrial relacionado à hipertrofia (ANP), e anti-hipertrofia induzida pelo gene TNF-A A20. Em nosso estudo, ETA não influenciou significativamente níveis de IL-10. Segundo BILATE et al. 2007, o uso de ETA em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica não seria possível devido ao agravamento dessa condição. ³⁷

De forma contrária ao estudo de Bilate et al., nossos resultados apontam que o tratamento com ETA em portadores CARD2 teve correlação positiva e moderada entre IL-4 e %FEVE, o que pode sugerir um mecanismo de proteção adicional nesses portadores, e que o uso do ETA deva ser mais investigado e estudado. Como discutido anteriormente IL-4 juntamente com a IL-13, desempenham ações antagônicas contra uma resposta Th1.

Em outro estudo a terapia com Infliximab mostrou ser promissora no tratamento de camundongos infectados cronicamente. O bloqueio do TNF além de não reativar a infecção, levou a uma diminuição das células T e macrófagos no coração, além do impacto na diminuição de citocinas pro-inflamatórias e aumento ou manutenção de IL-10. ³⁸⁻³⁹ O bloqueio com Infliximab restaurou a frequência

cardíaca normal pelos dados do eletrocardiograma. Também reduziu a proporção de animais afetados por arritmias e bloqueio átrio ventricular. PEREIRA et al. (2014) viram que houve diminuição de TNFR1 em células T após o tratamento. O bloqueio interrompeu a retroalimentação positiva da sinalização TNF/TNFR1, e dessa forma levou a diminuição da ativação celular induzida pelo TNF. ³⁹

Para nosso conhecimento, durante a busca de trabalhos na literatura, encontramos uma única publicação de agentes biológicos anti-TNF e doença de Chagas, sendo um relato de caso de um homem de 58 anos que tinha psoríase desde os 14 anos, com 80% de envolvimento cutâneo, iniciou a terapia com Etanercept mas sem sucesso. Assim, a terapia foi modificada para utilização de Adalimumab com evolução clínica favorável. Porém há muito tempo o paciente relatava muita constipação e finalmente descobriu-se ser portador crônico da forma digestiva da doença de Chagas. Assim, a terapia com adalimumab teve que ser interrompida para dar início ao tratamento etiológico e as lesões psoriáticas voltaram e o paciente teve que receber as duas drogas (Nifurtimox + Adalimumab), e foi um sucesso, a doença de chagas não foi reativada e a doença autoimune controlada. ²⁹

Estudos envolvendo essa abordagem devem ser encorajados, uma vez que a doença de chagas é uma patologia crônica e que na maioria das vezes de evolução lenta, muitos portadores não sabem que tem a doença, pois 70% se encontram na forma assintomática, com exames de imagem normais. ¹⁻⁷ Muitos descobrem ao acaso quando doam sangue ou transplante de órgão. ⁶ Além disso, o perfil epidemiológico desses portadores são pessoas em idade avançada, sobretudo mulheres, e justamente nessa idade que muitas doenças reumatológicas surgem como artrite reumatóide e espondilite anquilosante. ⁴⁰⁻⁴¹ A eficácia das drogas disponíveis Bz e Nifurtimox é baixa na fase crônica da doença de Chagas, fase em que a maioria dos pacientes é diagnosticada, e há efeitos colaterais frequentes. ⁴² Além disso, alguns fatores como idade, distribuição geográfica, background imunológico do hospedeiro e a resistência natural de algumas cepas de *T. cruzi* ao fármaco podem afetar a eficácia do tratamento. ⁴³⁻⁴⁵

Nesse contexto, buscamos avaliar o perfil de citocinas em células mononucleares de portadores crônicos quando tratadas com inibidores de TNF em associação com o Benzonidazol (Bz), que é uma droga de escolha no tratamento etiológico no Brasil

Nossos resultados apontam que o Benzonidazol isolado (Bz) não impactou de forma significativa a produção de citocinas entre os portadores crônicos (IND vs CARD1 vs CARD2), porém quando comparado aos grupos controles (NEG e IDI OP), todas as citocinas do perfil pró-inflamatório (TNF, IFN, IL-2), diminuíram em portadores de cardiopatia chagásica crônica (CARD1 e CARD2). IL-4 também diminuiu em portadores IND e CARD2 quando comparados aos saudáveis, sendo esta citocina, a única do perfil regulatório afetada.

Portanto, o tratamento com o Bz promove eventos imunomodulatórios na resposta imune do hospedeiro. No estudo de Soares et al., (2021) foi observado que PBMC infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com Bz *in vitro* atuam regulando positivamente o processo de ativação celular, a apresentação de antígeno e ativação de macrófagos; e que não induz uma resposta imune exacerbada.⁴⁶ Em contrapartida, como a eficácia do fármaco pode variar de acordo com a cepa de *T. cruzi* avaliada, no estudo de Moreira et al., (2023) foi demonstrado que o tratamento com Bz em PBMC infectados *in vitro* com a cepa colombiana de *T. cruzi* não promoveu mudanças significativas quanto a produção de citocinas, entretanto aumentou a expressão de CTLA-4 em células T CD4+ e CD8+ e promoveu uma diminuição de HLA-DR em monócitos infectados pela cepa colombiana, reduzindo indiretamente a inflamação.⁴⁴ Em modelo murino, Cevey et al. (2015) observaram que camundongos infectados com a cepa RA de *Trypanosoma cruzi* quando tratados em baixas doses de Bz (25 mg/kg/day) demonstraram diminuição da parasitemia e uma significativa diminuição da expressão de IL-6.⁴⁷ Dessa forma, foi demonstrado que embora não elimine o parasita, o Bz é um elemento importante na redução da inflamação exacerbada, ainda em cepas naturalmente resistentes ao fármaco.

Em modelo humano, Vitteli-Avellar et al (2008), verificaram uma redução na produção de IL-10 por células T CD4+ em indivíduos com a forma indeterminada e aumento de monócitos IL-10+ na forma cardíaca da doença de Chagas crônica, um ano após tratamento.⁴⁸ No estudo de Campi-Azevedo et al. (2015) foi avaliado o padrão de citocinas e efeitos imunomodulatórios antes e após 1 ano do tratamento em indivíduos IND e CARD, e foi observado que ocorreu diminuição de IFN- γ e aumento de IL-10 no grupo CARD tratado, similarmente ao observado no grupo IND antes do tratamento.⁴⁹ Em crianças com forma indeterminada inicial, houve produção de IFN em linfócitos, com predominância de um perfil Th1.⁵⁰⁻⁵¹ Já Laucella et al.,

(2009) observaram uma redução na produção de IFN por linfócitos T, um ano após o tratamento.⁵² Efeitos benéficos também foram constatados em um estudo de coorte prospectivo onde foi observado redução significativa da parasitemia, menor prevalência de marcadores de cardiomiopatia grave e menor mortalidade após dois anos de acompanhamento de pacientes com doença de Chagas crônica que receberam ao menos um ciclo de tratamento com Bz.⁵³ Portanto, o Bz persiste como um fármaco relevante no que tange a alterações imunomodulatórias, embora não consiga eliminar de forma consistente o parasita.⁵⁴

Diante desse cenário, é importante o uso do Bz em associação com outras drogas. Nesse estudo associamos o Bz com dois biológicos anti-TNF (ADA+BZ e ETA+BZ). O impacto dessas associações foi observado tanto em ADA+BZ quanto em ETA+BZ. A associação entre ADA e BZ levou a uma predominância de um perfil Th2, sobretudo por aumento da IL-4 em portadores CARD1 quando comparado ao grupo CARD 2 e IND. Além disso impactou na diminuição da IL-2 em indivíduos CARD 2 quando comparados ao grupo NEG. Além disso ETA + BZ diminuíram níveis de TNF em CARD 1 quando comparado ao grupo IDIOP, o que reforça o quanto a cardiopatia de origem chagásica tem relação com o TNF.

No relato de caso descrito por Navarrete-Dechent et al (2015) o acompanhamento utilizando a quantificação de DNA do parasito no sangue por RT-PCR não mostrou nenhuma evidência de reativação da doença de Chagas com o uso de etanercepte ou adalimumabe.²⁹ Esses dados podem ser uma alternativa promissora para esses portadores crônicos que já não se beneficiam mais do tratamento etiológico, a associação com inibidores de TNF devem ser investigados mais detalhadamente, sobretudo com relação a reativação de outras doenças.

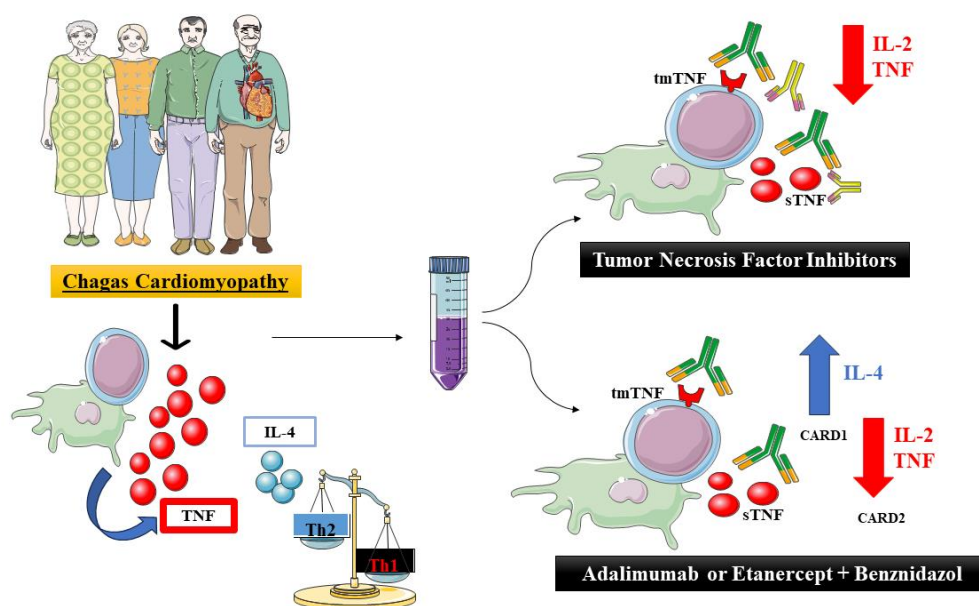


Figura 7. Resumo dos principais achados sobre a dinâmica de produção de diferentes citocinas inflamatórias e regulatórias tratadas com inibidores do TNF isoladamente ou associados ao Benzonidazol em células mononucleares de pacientes com cardiopatia chagásica crônica.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Diego José Lira Torres: Conceituação, Metodologia, Software, Validação, Análise formal, Investigação, Curadoria de dados, Visualização. **Kamila Kássia dos Santos Oliveira:** Metodologia, análise formal. **Michelle da Silva Barros:** Análise formal, Curadoria de dados, Investigação. **Leyllane Rafael Moreira:** Análise formal, **Luciane de Freitas Firmino:** Metodologia. **Maria da Piedade Costa Reis de Albuquerque, Maria da Glória Aureliano Melo Cavalcanti e Wilson Alves de Oliveira Junior** Metodologia. Seleção e classificação de pacientes com doença de Chagas. **Michelle Christiane da Silva Rabello** Redação – revisão e edição. **Virginia Maria Barros de Lorena:** Conceituação, Metodologia, Recursos, Curadoria de dados, Redação – revisão e edição, Supervisão, Administração do projeto, Captação de recursos

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos aos pacientes que participaram do estudo, bem como o apoio de toda a equipe do Ambulatório de Doença de Chagas (Casa de Chagas) Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco e Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

INFORMAÇÕES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (Universal/CNPq 474926/2012-5); e o Programa de Excelência em Pesquisa da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Proep-Facepe APQ-1703-2.11/15).

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

REFERÊNCIAS

1. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet Lond Engl*. 2018; 391(10115): 82-94.
2. WHO. Chagas Disease in Latin America: An Epidemiological Update Based on 2010 Estimates. *Wkly. Epidemiol. Rec*. 2015, 90, 33–43.
3. Nunes MCP, Beaton A, Acquatella H et al. Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2018;138(12):e169-e209. doi: 10.1161/CIR.0000000000000599
4. Echavarría NG, Echeverría LE, Stewart M et al. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Curr. Probl. Cardiol*. 2021, 46, 100507
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas. Brasília. 2021.p:1-38.
6. Dias JCP, Jr Ramos AN, Gontijo ED et al. 2nd Brazilian consensus on Chagas Disease, 2015. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(Suppl 1):3–60. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0505-2016>
7. Magalhães LMD, Gollob KJ, Zingales B et al. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human-host interactions. *Lancet Microbe*. 2022 Sep;3(9):e711-e722. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00265-2. Epub 2022 Mar 10. PMID: 36058233
8. Montalvo-Ocototile IG, Rojas-Velasco G, Rodríguez-Morales O et al. Chagas Heart Disease: Beyond a Single Complication, from Asymptomatic Disease to Heart Failure. *J Clin Med*. 2022; 11(24):7262. <https://doi.org/10.3390/jcm11247262>
9. Dutra WO, Menezes CAS, Villani FNA et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. 2009. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (1), 208–218.

10. Acevedo GR, Girard MC, Gómez KA. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. 2018. *Front. Immunol.* 9, 1929.
11. Rodrigues MM, Ribeirão M, Pereira-Chiocola V et al. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with aDNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect Immun.* (1999) 67:3855–63.184.
12. Kumar S, Tarleton RL. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol.* 2001 166:4596–603. doi: 10.4049/jimmunol.166.7.4596185.
13. Hoft DF, Eickhoff CS. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen. *Infect Immun.* 2005 Aug;73(8):4934-40. doi: 10.1128/IAI.73.8.4934-4940.2005.
14. Koh CC, Neves EGA, Souza-Silva TG et al. Cytokine Networks as Targets for Preventing and Controlling Chagas Heart Disease. *Pathogens* 2023, 12, 171. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020171>.
15. Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1- specific immune response. 2003 *Infect. Immun.* 71, 1185–1193
16. Keating SM, Deng X, Fernandes F et al. International Component. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. *Int J Cardiol.* 2015 Nov 15; 199:451-9. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.07.040. Epub 2015 Jul 12. PMID: 26277551; PMCID: PMC4868386
17. Souza GR, Gomes JAS, Fares RCG et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. 2014 *PLoS ONE* 6;9(3):e87082. doi: 10.1371/journal.pone.0087082. eCollection 2014.
18. Almeida MS, Lorena VMB, Medeiros CA et al., 2018. Alternative Th17 and CD4+ CD25+ FoxP3+ cell frequencies increase and correlate with worse cardiac function in Chagas cardiomyopathy. *Scand. J. Immunol.* 2018 Apr;87(4):e12650. doi: 10.1111/sji.12650.
19. Rodrigues DBR, dos Reis MA, Romano A et al. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012:361730. doi: 10.1155/2012/361730. Epub 2012 Jul 3. PMID: 22811738; PMCID: PMC3397162.
20. Torres DJL; Arruda TR; Barros MS et al. Is a negative correlation between sTNFR1 and TNF in patients with chronic Chagas disease the key to clinical progression? *Immunobiology*, [S.L.], v. 227, n. 1, p. 152166, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152166>.

21. Silva WT, Costa HS, Lima VP et al., 2020. Plasma levels of soluble TNF receptors are associated with cardiac function in patients with Chagas heart disease. *Int. J. Cardiol.* 316, 101–103. doi: 10.1016/j.ijcard.2020.04.053. Epub 2020 Apr 19.
22. Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA et al. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4⁺T cells to immune senescence. *J Immunol.* 2009 Sep 15; 183(6): 4103–4108. doi: 10.4049/jimmunol.0900852
23. Bestetti RB, Dellalibera-Joviliano R, Lopes GS et al. Determination of the Th1, Th2, Th17, and Treg Cytokine Profile in Patients with Chronic Chagas Heart Disease and Systemic Arterial Hypertension. *Heart Vessels* 2019, 34, 123–133. doi: 10.1007/s00380-018-1228-z.
24. Loo GV, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2023 May;23(5):289-303. doi: 10.1038/s41577-022-00792-3. Epub 2022 Nov 15. PMID: 36380021; PMCID: PMC9665039
25. Iwaszko M, Biały S, Bogunia-Kubik K. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells.* 2021; 10(11):3000. <https://doi.org/10.3390/cells10113000>
26. Soares MBP, Silva-Mota KN, Lima RS et al. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. 2001 *Am J Pathol* 159: 703-709 doi: 10.1016/S0002-9440(10)61741-5
27. Lorena VMB, Lorena IMB, Braz SCM et al. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. 2010 *Scand. J. Immunol.* 72 (6), 529–539. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02462. x.
28. Bosch-Nicolau P, Ubals M, Salvador F et al. Leishmaniasis and tumor necrosis factor alpha antagonists in the Mediterranean basin. A switch in clinical expression. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Aug 30;13(8):e0007708. doi: 10.1371/journal.pntd.0007708.
29. Navarrete-Dechent C, Majerson D, Torres M et al. Use of tumor necrosis factor alpha (TNF α) antagonists in a patient with psoriasis and Chagas disease. *An Bras Dermatol.* 2015 May-Jun;90(3 Suppl 1):171-4. doi: 10.1590/abd1806-4841.20153538.
30. Gibellini L, De Biasi S, Bianchini E et al. Anti-TNF- α Drugs Differently Affect the TNF α -sTNFR System and Monocyte Subsets in Patients with Psoriasis. *PLoS One.* 2016 Dec 9;11(12):e0167757. doi: 10.1371/journal.pone.0167757.
31. Hetland ML, Christensen IJ, Tarp U et al. Direct comparison of treatment responses, remission rates, and drug ad-herence in patients with rheumatoid arthritis treated with Adalimumab, Etanercept, or Infliximab. Results from eight

- years of surveillance of clinical practice in the nationwide Danish DANBIO registry. 2010 *Arthritis Rheum.* 62,22–32. doi: 10.1002/art.27227
32. Hu X, Li B, Li X et al. Transmembrane TNF- α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J Immunol.* 2014 Feb 1;192(3):1320-31. doi: 10.4049/jimmunol.1203195. Epub 2013 Dec 30. PMID: 24379122.
 33. Weisman MH, Moreland LW, Furst DE et al. Efficacy, pharmacokinetic, and safety assessment of adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibody, in adults with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a pilot study. *Clin Ther.* 2003 Jun;25(6):1700-21. doi: 10.1016/s0149-2918(03)80164-9. PMID: 12860493.
 34. Santora LC, Kaymakcalan Z, Sakorafas P et al. Characterization of noncovalent complexes of recombinant human monoclonal antibody and antigen using cation exchange, size exclusion chromatography, and BIAcore. *Anal Biochem* 2001; 299:119-29
 35. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 2011 Oct;23(5):598-604. doi: 10.1016/j.coi.2011.08.003. Epub 2011 Aug 31. PMID: 21889323; PMCID: PMC3405730.
 36. Wallis RS. Reactivation of latent tuberculosis by TNF blockade: the role of interferon gamma. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2007 May;12(1):16-21. doi: 10.1038/sj.jidsymp.5650031. PMID: 17502864
 37. Bilate AMB, Salemi VM, Ramires FJ et al. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes Infect.* 2007 Jul;9(9):1104-13. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.014. Epub 2007 May 18. PMID: 17644389.
 38. Pérez AR, Bottasso O, Savino W. The impact of infectious diseases upon neuroendocrine circuits. 2009 *Neuroimmunomodulation* 16, 96–105. doi: 10.1159/000180264.
 39. Pereira IR, Vilar-Pereira G, Silva AA et al. Tumor necrosis factor is a therapeutic target for immunological unbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental Chagas' heart disease. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:798078. doi: 10.1155/2014/798078. Epub 2014 Jul 22. PMID: 25140115; PMCID: PMC4130030.
 40. Venetsanopoulou AI, Alamanos Y, Voulgari PV et al. Epidemiology of rheumatoid arthritis: genetic and environmental influences, 2022 *Expert Ver Clin Immunol.* 18:9, 923-931, DOI: 10.1080/1744666X.2022.2106970

41. Finckh A, Gilbert B, Hodgkinson B et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis. 2022 Nat Rev Rheumatol 18, 591–602. <https://doi.org/10.1038/s41584-022-00827-y>
42. Pérez-Molina JA, Crespillo-Andújar C, Bosch-Nicolau P et al. Trypanocidal treatment of Chagas disease. 2021 Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). 39(9):458-470. doi: 10.1016/j.eimce.2020.04.012
43. Ciapponi A, Barreira F, Perelli L et al. Direct evidence gap on fixed versus adjusted-dose benznidazole for adults with chronic Chagas disease without cardiomyopathy: Systematic review and individual patient data meta-analysis. 2023 Trop Med Int Health. Jan;28(1):2-16. doi: 10.1111/tmi.13831. Epub 2022 Dec 1. PMID: 36420767.
44. Moreira LR, Dos Santos KK, Torres DJL et al. Benznidazole treatment has a beneficial effect on cells infected with the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* [published online ahead of print, 2023 Apr 17]. Parasite Immunol. 2023; e12983. doi:10.1111/pim.12983
45. Pandey RP, Nascimento MS, Franco CH et al. Drug Repurposing in Chagas Disease: Chloroquine Potentiates Benznidazole Activity against *Trypanosoma cruzi* *In Vitro* and *In Vivo*. Antimicrob Agents Chemother. 2022 Nov 15;66(11):e0028422. doi: 10.1128/aac.00284-22. Epub 2022 Oct 31. PMID: 36314800; PMCID: PMC9664849.
46. Soares AKA, Neves PAF, Nascimento AV et al. Benznidazole: Hero or villain of cellular immune response in chronic Chagas disease patients? Immunobiology. 2021 Jan;226(1):152046. doi: 10.1016/j.imbio.2020.152046. Epub 2020 Dec 4. PMID: 33341661
47. Cevey AG, Mirkin GA, Penas FN et al. Low dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2016;6(1):12–22. doi: 10.1016/j.ijpddr.2015.12.001
48. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A et al. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. 2008 Scand. J. Immunol. 68, 516–525. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008. 02167.x
49. Campi-Azevedo AC, Gomes JAS, Teixeira-Carvalho A et al. Etiological treatment of Chagas disease patients with benznidazole lead to a sustained pro-inflammatory profile counterbalanced by modulatory events. 2015 Immunobiology. 220(5):564–74. doi: 10.1016/j.imbio.2014.12.006
50. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL et al. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile.

- Scand J Immunol. 2006 Nov;64(5):554-63. doi: 10.1111/j.1365-3083.2006.01843.x. PMID: 17032249.
51. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RM et al. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes Infect.* 2008; 10:103–113
 52. Laucella SA, Mazliah DP, Bertocchi G et al. Changes in *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. *Clin Infect Dis.* 2009 Dec 1;49(11):1675-84. doi: 10.1086/648072. PMID: 19877967; PMCID: PMC2805187.
 53. Cardoso CS, Ribeiro ALP, Oliveira CDL et al. Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease: NIH SaMi-Trop cohort study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(11):e0006814. Published 2018 Nov 1. doi:10.1371/journal.pntd.0006814
 54. Galván IL, Alonso-Padilla J, Cortés-Serra N et al. Benznidazole for the treatment of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2021;19(5):547-556. doi:10.1080/14787210

6.3 Artigo 3: Será submetido na *Tropical Medicine & International Health*

Populações de células expressam níveis diferenciais de Receptores TNFR1 e TNFR2, mas Linfócitos TCD8+ expressando TNFR1 são associados ao dano cardíaco em portadores de cardiopatia chagásica crônica

O estudo investigou a expressão de receptores (TNFR1 e TNFR2) e citocinas (TNF e IL-10) em diversas populações celulares, como linfócitos TCD4+, TCD8+ e T regulatórios (Tregs), bem como monócitos totais (CD14+) e subpopulações de monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos) em diferentes formas clínicas da doença de Chagas (forma indeterminada, IND: 11, forma cardíaca leve, CARD1: 9 e forma cardíaca grave, CARD2: 11). Na forma indeterminada (IND) da doença, foi notado um aumento significativo da expressão de TNFR1 em células CD16+ e monócitos totais em comparação com células Tregs e TCD4+. Contrariamente, a expressão de TNFR2 diminuiu nas células CD16+ e CD14+ quando comparada com as células TCD8+. Entretanto, em CARD2, houve aumento de TNFR1 em linfócitos TCD8+ e expressão reduzida de TNFR2 em CD16+. Na análise de monócitos, a frequência de TNFR1 foi maior em monócitos não clássicos em comparação com os monócitos clássicos, independentemente da forma clínica. Ao contrário, a frequência de TNFR2 foi mais alta nos monócitos intermediários do que nos clássicos, independente da forma clínica. Nas formas cardíacas, os linfócitos TCD8+ expressando TNFR1 se correlacionaram positivamente com o % FEVE, sugerindo dano cardíaco. Além disso, a frequência de TNFR2 em monócitos clássicos e intermediários aumentou à medida que o %FEVE aumentou, indicando uma possível relação com a função cardíaca. As correlações entre TNFR1 e TNFR2 variaram nas diferentes populações de células e formas clínicas. Nas formas cardíacas, houve correlações positivas entre TNFR1 e TNFR2 em células CD14+ e CD16+, ao passo que na forma IND, houve uma correlação negativa entre esses receptores em células CD14+ e CD16+. Esses resultados sugerem que as diferentes populações celulares e suas interações podem desempenhar papéis cruciais nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, especialmente nas manifestações cardíacas. A complexa rede de receptores, citocinas e correlações observadas revela informações valiosas sobre os mecanismos subjacentes às alterações celulares e ao dano cardíaco associado à doença.

Palavras-chave: Cardiopatia chagásica; TNFR1; TNFR2; Células mononucleares

1 | INTRODUÇÃO

A doença de chagas tem como agente etiológico o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que possui ciclo de vida heteroxênico parasitando hospedeiros invertebrados e uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados. Devido a migração de portadores de áreas endêmicas, como América do Sul, para áreas não endêmicas como a América do Norte e Oceania, a doença de Chagas

passa por um processo de globalização, o que a coloca como um grande problema de saúde pública mundial (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; WHO, 2010).

Era estritamente rural com ciclo de transmissão majoritariamente vetorial com participação de várias espécies de triatomíneos. Mas, atualmente a forma de contaminação pela via oral tem chamado atenção e alertado para implementação de medidas sanitárias urgentes. A doença culmina com duas fases: aguda e crônica. A fase aguda, na maioria das vezes, é assintomática ou pouco sintomática (COSTA-OLIVEIRA et al., 2023; ECHAVARRIA et al., 2021).

No entanto a fase crônica da doença de Chagas é complexa, atingindo diversos órgãos, podendo levar a morte. A maior parte dos portadores crônicos, se encontram assintomáticos, conhecido como forma clínica indeterminada, enquanto uma pequena porcentagem, cerca de 30% (por mecanismos ainda não elucidados) desenvolvem formas sintomáticas de acordo com o órgão afetado: coração (forma cardíaca ou cardiopatia chagásica crônica); esôfago e intestino (forma digestiva ou megacólon e megaesôfago), forma mista, quando afeta coração e trato gastrointestinal e uma forma mais rara, quando atinge o sistema nervoso, conhecida como forma nervosa (DIAS et al., 2016).

A resposta imune nesses portadores tem sido bastante estudada, já é bem estabelecido que portadores da forma indeterminada possuem uma resposta predominantemente regulatória envolvendo células T regulatórias e citocinas anti-inflamatórias como IL-10. Em contrapartida, os portadores da forma cardíaca parecem apresentar uma desregulação (com perda de mecanismos regulatórios), com diminuição de citocinas anti-inflamatórias e aumento de citocinas pró-inflamatórias, sobretudo o fator de necrose tumoral (TNF) estando associado com participação de linfócitos TCD4 e TCD8 e relacionados ao dano cardíaco (GOMES et al., 2003; LANNES-VIEIRA et al., 2003; DUTRA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2012).

O TNF existe como duas formas de sinalização: trímero transmembranar (mbTNF), que se liga a outras células numa sinalização parácrina clássica e um trímero solúvel (sTNF), que é resultado de uma clivagem realizada pela enzima conversora de TNF (TACE ou ADAM17). Dessa forma, com a ação da enzima TACE, o mbTNF é convertido a TNF solúvel (sTNF), que é a forma circulante com capacidade endócrina de agir em locais distantes (BLACK et al., 1996; MOSS et al., 1997; SEDGER; MCDERMOTT, 2014).

O sTNF e o mbTNF se ligam aos seus receptores transmembranares, os receptores de fator de necrose tumoral do tipo 1 (TNFR1/TNFRSF1/CD120A ou p55) e do tipo 2 (TNFR2/TNFRSF1B/CD120B ou p75), onde o mTNF é um ligante mais potente para TNFR2, e o sTNF pelo TNFR1. O TNFR1 é encontrado constitutivamente na maioria das células, porém o TNFR2 tem expressão muito mais restrita à células imunes, como Monócitos, Linfócitos T reg (levando a uma estimulação dessa subpopulação de células) além de células endoteliais e neurônios (CARPENTIER; COORNAERT; BEYAERT, 2004), mas ambos podem interagir na célula, pelo fenômeno conhecido como “passagem de ligante” regulando a associação de TNF com o TNFR1. Esses receptores também são clivados pela TACE e se tornam receptores solúveis do tipo 1 e 2 (sTNFR 1 e sTNFR2) considerados potentes inibidores naturais de TNF, uma vez que são capazes de competir pelo sítio de ligação da citocina, modulando sua bioatividade (ADERKA et al., 1992; VAN ZEE *et al.*, 1992; MOHAMED-ALI et al., 1999).

Já foi demonstrado, *in vivo*, que a via TNF/TNFR1 parece ser essencial na sobrevivência de animais infectados pelo *T. cruzi*. (ALIBERTI et al., 2001; CASTAÑOS-VELEZ *et al.*, 1998; KROLL-PALHARES *et al.*, 2008; PÉREZ *et al.*, 2007, 2017; VILLAR *et al.*, 2013). Porém em humanos os estudos envolvendo esses receptores em células que participam da resposta imune em portadores crônicos são escassos. Apesar de mais de cem anos desde sua descoberta, muitos aspectos continuam não esclarecidos, como quais mecanismos estão envolvidos na evolução dos portadores assintomáticos a desenvolverem sintomas, ou porque muitos portadores permanecem sem sintomas por muitos anos. Dessa forma, esse trabalho buscou avaliar a expressão de TNFR1 e TNFR2 em linfócitos e subpopulações de monócitos em portadores de doença de Chagas crônica com diferentes graus de acometimento cardíaco.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1| População de estudo

Foram selecionados 31 portadores crônicos atendidos no ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. A classificação clínica foi realizada seguindo o II Consenso em doença de Chagas e pela I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (DIAS et al., 2016). Assim, os portadores realizaram exames clínicos como Ecocardiograma, Eletrocardiograma, Raio X de Tórax e Esôfago. Os portadores crônicos foram incluídos no estudo quando: apresentavam sorologia reagente para infecção pelo *T. cruzi*, não ter sido submetido ao tratamento etiológico ou um mínimo de 3 a 5 anos, além de não possuírem marcapasso, doenças infecto parasitárias e doenças endócrinas que poderiam afetar o sistema imunológico.

Desta forma, foram estabelecidos os grupos de pacientes: Forma indeterminada (IND) (n=11), sem sintomas cardíacos, com eletrocardiograma (ECG) e ecocardiograma (ECO) normais; Forma cardíaca leve (CARD 1) (n=9), 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); Forma cardíaca grave (CARD 2) (n=11) com disfunção ventricular e sintomas atuais ou anteriores de insuficiência cardíaca congestiva.

E um grupo constituído por portadores de cardiopatia não chagásica, sem definição da causa de base, sendo, portanto, classificados como portadores de cardiopatia idiopática-IDIOP (n=6). É importante salientar que este último grupo apresenta percentual de Fração de Ejeção Ventricular Esquerdo -%FEVE (medida importante de dano cardíaco), semelhante aos pacientes do grupo CARD2 (Tabela I).

Variáveis	IDIOP	IND	CARD 1	CARD 2
Número de pacientes	6	11	9	11
Idade (anos)	58.6 ± 12.8	60 ± 12.3	57.4 ± 12.9	60.2 ± 11.0
Sexo				
Masculino	2(33.33%)	1 (9.09%)	2 (22.22%)	5 (45.45%)
Feminino	4(66.67%)	10 (90.91%)	7 (77.78%)	6 (54.55%)
Altura (Metros)	1.62 ± 0.1	1.59 ± 0.09	1.55 ± 0.09	1.61 ± 0.07
Peso (Kg)	75.5±14.7	72.73±17.8	64.2±10.07	76.36±16.3
Região (Pernambuco)				
Sertão	-	4 (36.36%)	5 (55.56%)	1 (9.09%)
Agreste	-	2 (18.18%)	1 (11.11%)	4 (36.36%)
Mata	5(83.33%)	3(27.27%)	3 (33.33%)	2 (18.18%)
Metropolitana	1(16.67%)	2 (18.18%)	-	4 (36.36%)
Outros estados	-	-	-	-
Ecocardiograma				
FEVE (%)	39.4 ± 16.2*	65.2 ± 3.9	63.5 ± 4.2	41.4 ± 10.8*

Tabela 1: Características clínicas e epidemiológicas da população de estudo

*p<0.001 entre IDIOP e IND/CARD1. CARD2 entre IND e CARD1.

2.2 | Coleta de sangue e sorologia

Nove mililitros de sangue foram coletados em tubos contendo heparina sódica para realização de fenotipagem celular. Além disso, cinco mililitros de sangue foram coletados em tubo seco para obtenção de soro para realização da sorologia. Após retração do coágulo, os tubos secos foram centrifugados (900 x g/ 10 minutos a temperatura ambiente [TA]) e alíquotas de soro foram devidamente identificadas e armazenadas a -20°C na Soroteca do Serviço de Referência em doença de Chagas do Laboratório de Imunoparasitologia do IAM/Fiocruz. Foram utilizados dois testes imunoenzimáticos para a confirmação da infecção chagásica com registro ativo na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo um deles o Elisa convencional, kit comercial Test Elisa Chagas III (Biochile, Grupo Bio, Santiago, Chile). A microplaca é sensibilizada com lisado total das cepas de *T. cruzi* Tulahuén e Mn, incluindo antígenos de membrana altamente imunogênicos. E o outro, denominado Elisa recombinante, kit comercial Imuno-Elisa Wama (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil), que utiliza antígenos recombinantes purificados. A metodologia foi realizada conforme orientações dos fabricantes. Os resultados foram

interpretados como reagentes quando ambos os testes apresentarem reatividade, e não-reagentes quando ambos não apresentarem reatividade (DIAS et al., 2016). Amostras que se mantiverem discordantes mesmo após repetição dos testes foram interpretadas como inconclusivas, sendo excluídas da pesquisa.

2.3 Obtenção 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 (1 parte de Ficoll-Paque e 3 da mistura sangue-PBS). 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. Em seguida as PBMC's foram contadas em câmara de Neubauer através do corante de vitalidade Azul de Trypan (1:10) e ajustadas para a concentração de 1×10^6 células.

2.4 Imunofenotipagem

As células foram incubadas em tubos de cultura com adição de 1 μ L de Brefeldina A (GolgiPlug™, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂ para assegurar a retenção das citocinas no interior celular para marcação intracitoplasmática. Após o período de incubação, as células foram tratadas com 110 μ L de EDTA (20 mM) por 15min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 2 mL de PBS-Wash gelado. Os tubos foram então centrifugados a 400xg por 5 min à temperatura ambiente. Os anticorpos de superfície foram devidamente adicionados: anti- CD14-FITC, anti-CD16-PerCP, anti-CD4-PerCP, anti-CD8-FITC, anti-CD127-BV510, anti-CD120A-APC e anti-CD120B-PE em volumes previamente titulados. Após incubação de 30min ao abrigo da luz, as células foram permeabilizadas (Solução Perm-Wash, BD Biosciences), e incubadas com os anticorpos intracitoplasmáticos: anti-TNF-PECy7, anti-IL-10-BV421 e anti-FOXP3-CF594 por 30 minutos e após lavagens com tampão PBS contendo albumina sérica bovina a 0,5% (PBS-Wash), as células foram fixadas (Cytofix - BD Biosciences). Após estes procedimentos as células foram então estocadas a 4°C até o momento da aquisição no citômetro de fluxo FACS Aria III

(Beckton Dickson) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As análises foram realizadas através do *Software* FlowJo versão 10 (Beckton Dickson).

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism versão 8.0.2 Windows® (E.U.A.). A apresentação das variáveis foi feita através de medidas descritivas como: média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e interquartil. Foi aplicado o teste de normalidade, Shapiro-Wilk, para avaliação da distribuição das amostras. Para comparação de mais de três grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido dos pós teste de comparações múltiplas de Dunn. Para comparação da população de T reg foi aplicado o teste de Mann-Whitney. A avaliação das correlações foi realizada através do teste de correlação não-paramétrica de Spearman. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Comparação dos níveis de TNFR1 e TNFR2 em Linfócitos TCD4+, TCD8+, Treg, Células CD16+, Monócitos totais e subpopulações.

3.1.1 *Portadores da forma cardíaca grave têm níveis divergentes de TNFR1 e TNFR2 em monócitos totais, células CD16+ e Linfócitos TCD8+*

Inicialmente buscamos compreender a expressão de TNFR1 e TNFR2 nas diferentes populações de linfócitos (TCD4+, TCD8+ e Treg), células CD16+, monócitos totais (CD14+) e subpopulações de monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos). Verificamos um aumento de TNFR1 em monócitos totais (CD14+) e células CD16+ quando comparados ao células T reg e TCD4+ na forma IND (Fig. 1A). Na forma CARD2, a frequência de TNFR1 foi maior em células CD16+ em comparação com as T reg (Fig. 1C). Em contrapartida, TNFR2 teve sua expressão em CD16+ e CD14+ reduzida quando comparado às células TCD8+ (Fig. 1F). Assim, os portadores CARD2 possuem frequências aumentados deste receptor em linfócitos TCD8+. Para melhor entendimento da dinâmica dos receptores e distribuição nas células gráficos radar foram construídos (Fig1. G-L).

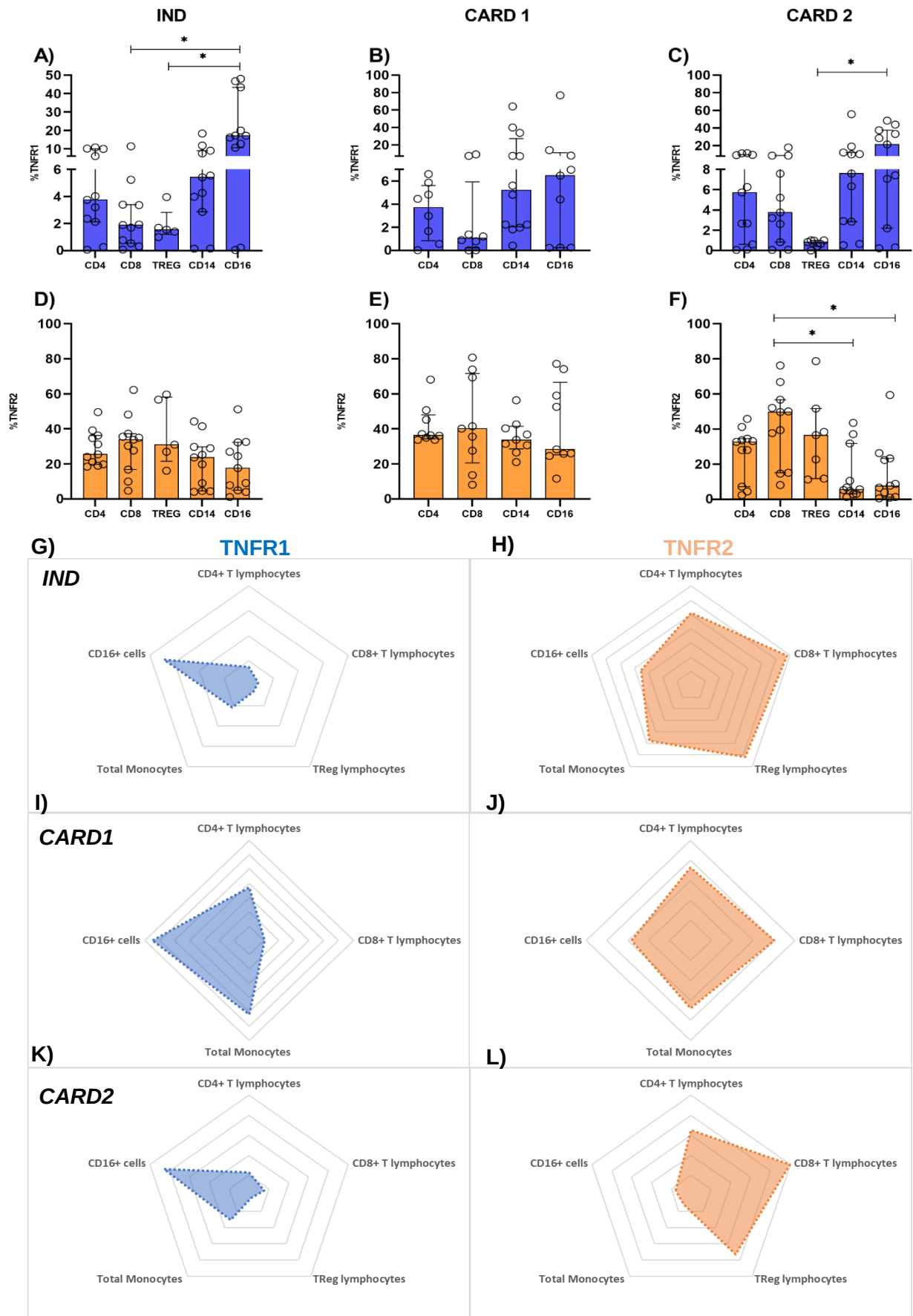


Figura 1. Comparação da expressão de TNFR1 (A, B, C) e TNFR2 (D, E, F) por Linfócitos, Monócitos e Células CD16+. Gráfico radar evidenciando a dispersão dos receptores (G-L). * $p < 0.05$, dados demonstrados como mediana

3.1.2 Níveis de *TNFR1* são maiores em monócitos não clássicos, enquanto *TNFR2* aumenta em monócitos intermediários em todas as formas clínicas

A expressão de *TNFR1* é maior na subpopulação de monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) em comparação aos monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) nas formas IND, CARD1 e CARD 2 (Fig. 2A, B e C). Na forma IND, monócitos não clássicos, além de aumentar em relação aos clássicos, também aumenta quando comparado aos monócitos intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) (Fig. 2A). De maneira contrária, monócitos intermediários tem níveis maiores de *TNFR2* em comparação aos clássicos em todas as formas clínicas (Fig. 2D, E e F).

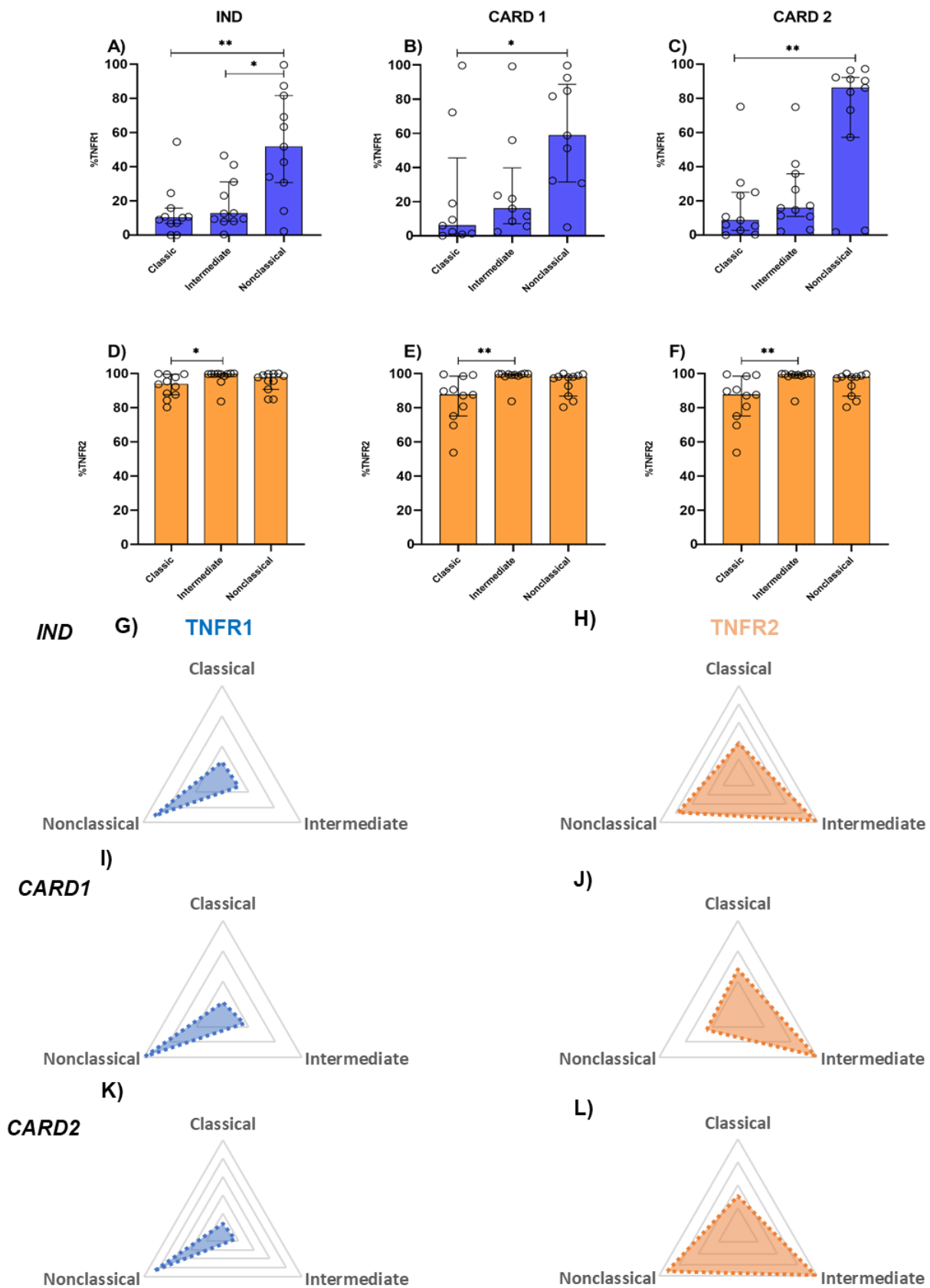


Figura 2. Comparação da expressão de TNFR1 (A, B, C) e TNFR2 (D, E, F) em subpopulações de monócitos. Gráfico radar evidenciando a dispersão dos receptores (G-L). * $p < 0.05$, dados demonstrados como mediana

3.2 Avaliação da expressão de TNF por Linfócitos TCD4+, TCD8+, Treg, Células CD16+, Monócitos totais e subpopulações comparando os grupos de pacientes

3.2.1 Expressão aumentada de TNF por linfócitos TCD4+ e TCD8+ em portadores cardíacos graves

Os níveis intracitoplasmáticos de TNF foram avaliados em todas as populações de células. Linfócitos TCD4+ e TCD8+ provenientes de portadores CARD2 expressam níveis maiores de TNF em comparação ao CARD1 (Fig. 3A, B). Ao avaliar as subpopulações de monócitos, nota-se que a produção de TNF em Monócitos Clássicos e Intermediários é reduzida em portadores da forma cardíaca grave (CARD2) e leve (CARD1), respectivamente (Fig. 3C, D).

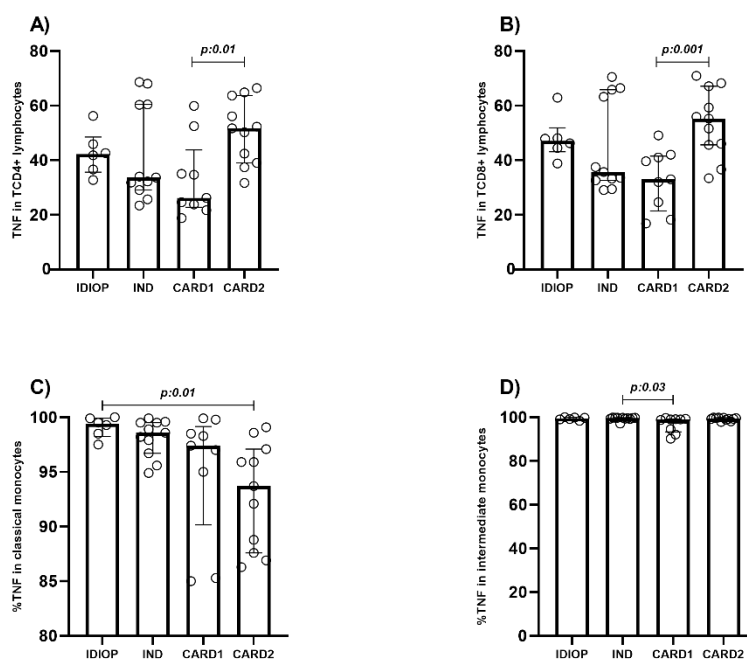


Figura 3. Expressão intracelular de TNF em Linfócitos e subpopulações de monócitos por grupo de portadores. Barras indicam mediana

3.3 Avaliação da expressão de TNFR1 e TNFR2 e citocinas em Linfócitos TCD4+, TCD8+, Treg, Células CD16+, Monócitos totais e subpopulações por grupo.

3.3.1 Linfócitos TCD4+ e TCD8+

Células TCD4+ e TCD8+ expressando TNFR1 produzem menores níveis de TNF em portadores cardíacos leves, enquanto TCD4+ e TCD8+ expressando TNFR2 produzem níveis intracitoplasmáticos maiores de TNF na forma cardíaca grave

Na figura 4 evidenciamos os dados significativos da expressão dos receptores e das citocinas em Linfócitos TCD4+ e TCD8+ em portadores de cardiopatia idiopática e portadores crônicos da doença de Chagas. Ao avaliarmos a expressão dos receptores TNFR1 e TNFR2 na população de células TCD4+, verificamos que células TCD4+CD120B+ aumentam na forma CARD1 quando comparado à forma IND (Fig. 4A). Ao avaliar a produção intracitoplasmática de TNF e IL-10 em linfócitos T CD4+ expressando TNFR1 e TNFR2, não foi encontrado diferenças estatísticas significativas na produção de IL-10, mas, constatamos aumento de TNF na população de células TCD4+CD120A+ e CD4+CD120B+ em portadores da forma CARD2 (Fig. 4B, C). A porcentagem de linfócitos TCD4+CD120A+TNF+ aumenta em portadores IND e CARD2 quando comparado ao CARD1 (Fig. 4B).

Em linfócitos TCD8+, a expressão de CD120B (TNFR2) foi maior em portadores IDIOP quando comparado à forma IND (Fig. 4D). Já a expressão de TNF seguiu o mesmo padrão encontrado para TCD4+ (Fig. 4E, F). De maneira adicional, Linfócitos TCD8+CD120B+ provenientes de portadores CARD2 tem níveis maiores de IL-10 quando comparado ao grupo CARD1 e IDIOP (Fig. 4G).

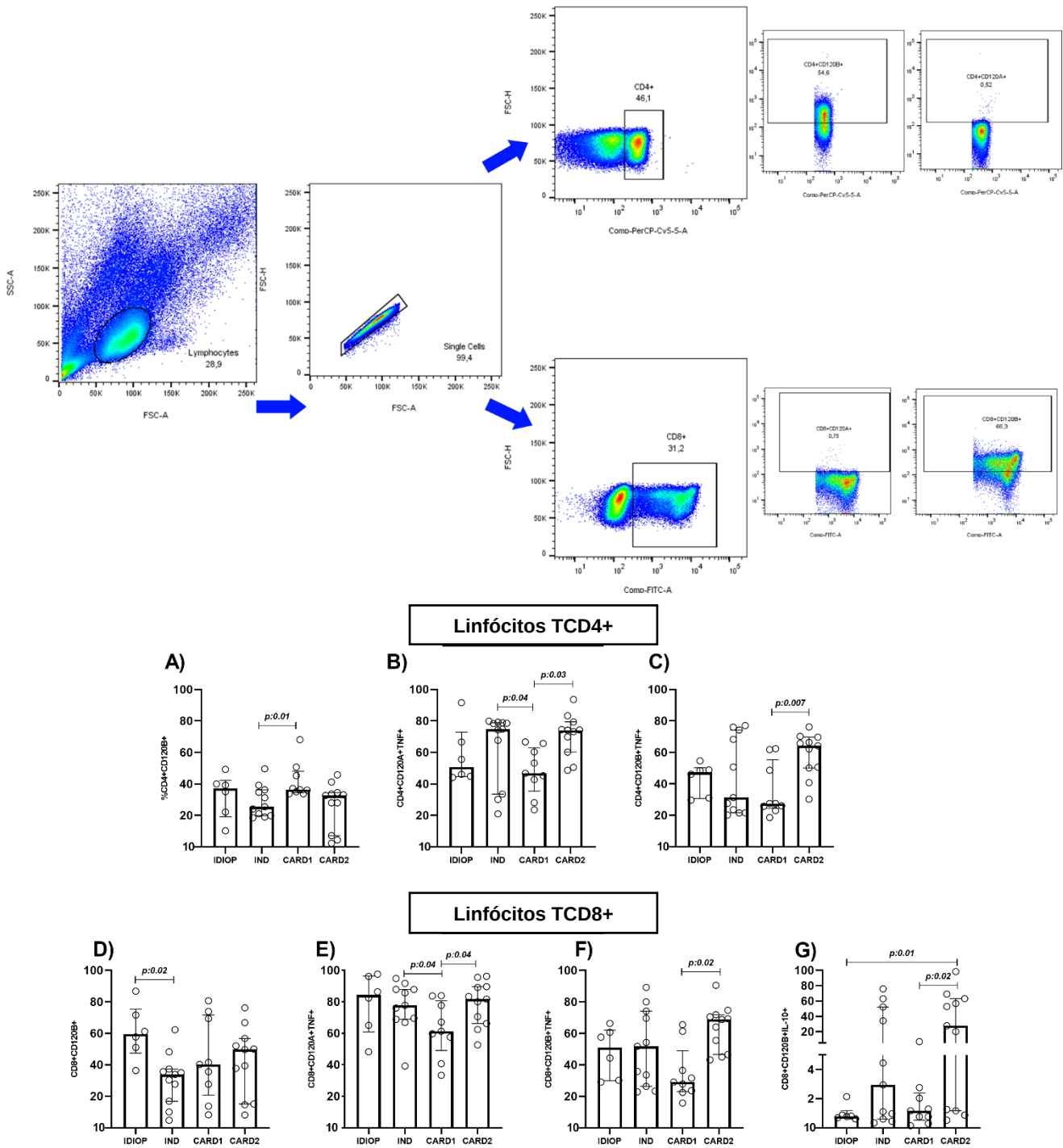


Figura 4. Estratégia de gate para seleção da população de linfócitos. Fig. A-C: expressão de receptores e citocinas intracelulares em linfócitos TCD4+. Fig. D-G: expressão de receptores e citocinas em linfócitos TCD8+. As barras indicam mediana

3.3.2 Linfócitos T regulatórios (T reg)

Linfócitos T reg aumentam na forma cardíaca grave, mas a população que expressa TNFR1 aumenta na forma indeterminada

Ao comparar células T regulatórias (TCD4+FOXP3+CD127-) entre portadores da forma IND e CARD2, verificamos um aumento dessa população em portadores cardíacos graves (Fig. 5A). Em contrapartida, o percentual de as células T reg expressando TNFR1, foi maior em portadores da forma IND quando comparada à forma CARD2 (Fig. 5B). Não foi encontrado diferenças estatísticas significativas na

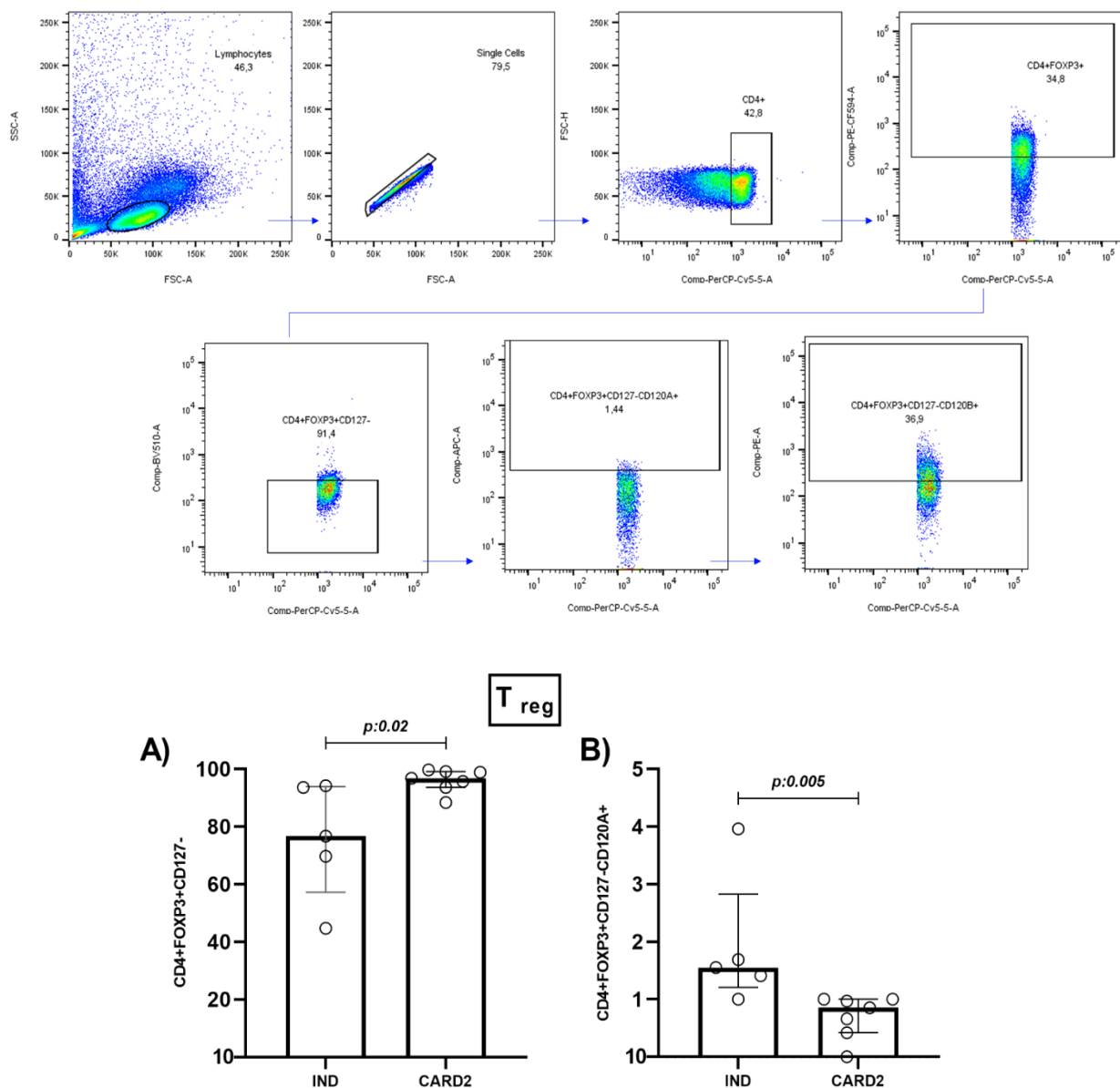


Figura 5. Estratégia de gate para seleção da população de Linfócitos T reg. Fig. A: células T reg. Fig B: Expressão de receptores. Barras indicam valores da mediana

frequência dessas células expressando TNFR2 bem como de citocinas TNF e IL-10.

3.3.3 Células CD16+ e Monócitos totais

Monócitos totais de portadores cardíacos graves expressam níveis baixos de TNFR2, mas com produção intracitoplasmática aumentada de TNF

Em monócitos totais (CD14+) e células CD16+ a frequência de TNFR2 foi menor em CARD2 quando comparados aos pacientes CARD1 (Fig. 6A, B), adicionalmente o percentual de células CD16+CD120B+ também foi menor em CARD2 quando comparado aos portadores da forma IND (Fig. 6B). Ao avaliar a expressão intracitoplasmática de TNF na população de CD14+, verificamos um aumento de CD14+CD120B+TNF+ em portadores com a forma CARD2 quando comparado à forma CARD1 (Fig. 6C). Já nas células CD16+, não verificamos diferenças estatísticas na expressão de CD120B+TNF+, mas sim em CD120A+TNF+. O percentual de células CD16+ expressando TNFR1 e TNF foram menores em portadores da forma CARD1 quando comparado a todos os outros grupos de pacientes (Fig. 6D).

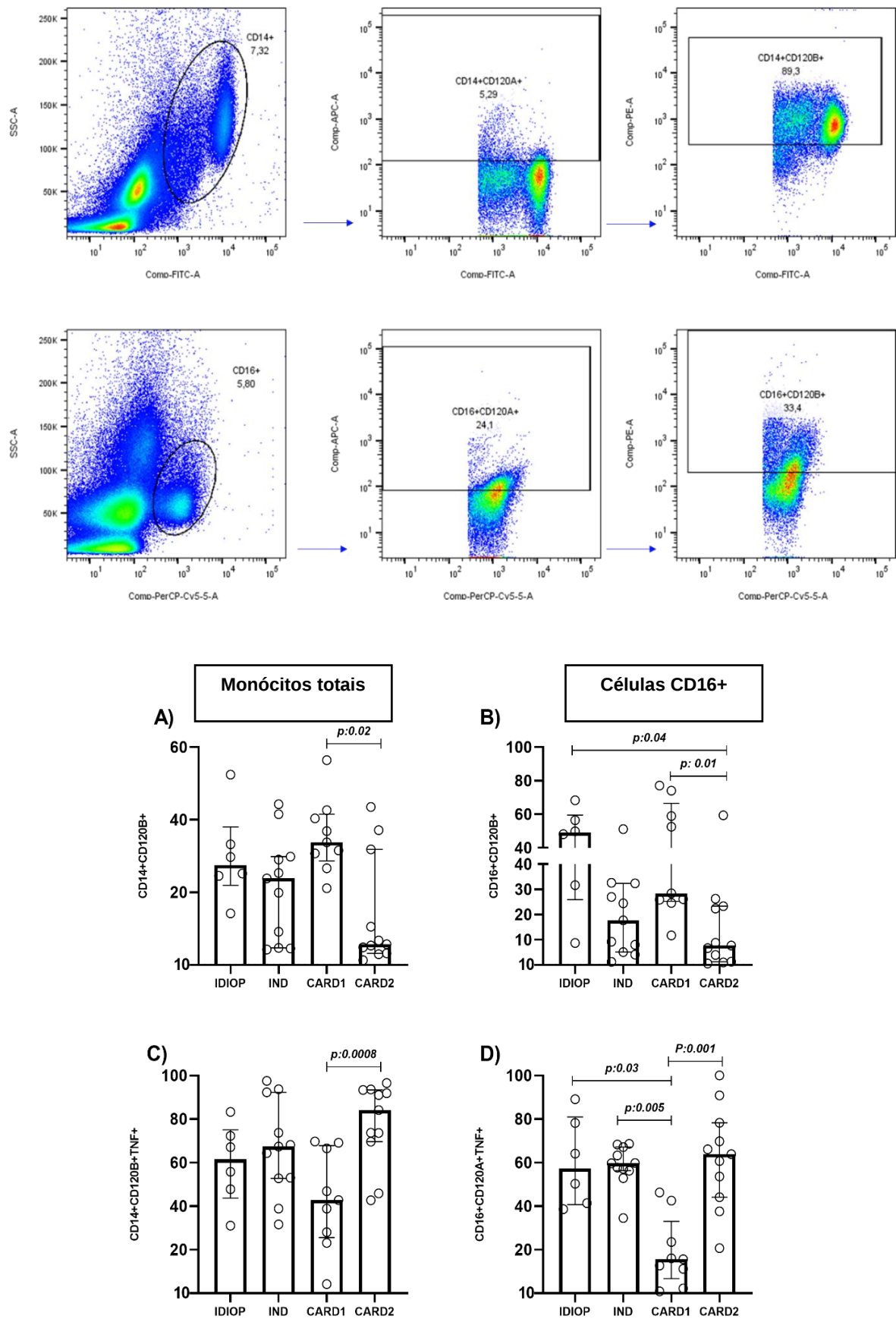


Figura 6. Estratégia de gate para seleção da população de monócitos totais e células CD16+. Fig. A, C: expressão de receptores em monócitos totais. Fig. B, D: expressão de receptores em células CD16+. Barras indicam valores medianos.

3.3.4 Subpopulações de monócitos

Monócitos clássicos, intermediários e não clássicos expressando TNFR1 e TNFR2 tendem a um mesmo perfil de produção de IL-10

Inicialmente comparamos as subpopulações de monócitos entre os grupos de pacientes (Fig. 7A, B e C) e constatamos diferença estatística significativa somente na avaliação da frequência de monócitos intermediários, onde houve uma diminuição desta subpopulação em portadores CARD1 quando comparados aos pacientes IDIOP (Fig. 7B). Analisamos também a expressão de TNFR1 e TNFR2 nas subpopulações. Somente monócitos não clássicos (CD14+CD16++) expressam níveis de TNFR1 estatisticamente significativos no grupo CARD2 quando comparado ao grupo IDIOP (Fig. 7F). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre essas diferentes subpopulações de monócitos expressando TNF (CD120A+TNF+/CD120B+TNF+).

A expressão de IL-10 foi verificada em todas as três subpopulações expressando concomitantemente TNFR1 e TNFR2 (Fig. 7D, E, G a I).

Ao analisarmos a subpopulação de monócitos clássicos expressando CD120A+ (Fig. 7D) e CD120B+ (Fig. 7G), verificamos o aumento do percentual dessas células produzindo IL-10 no grupo CARD2 quando comparado ao grupo IDIOP. O percentual de monócitos clássicos expressando CD120B+IL-10+ foi maior no grupo IND quando comparado ao IDIOP (Fig. 7G).

Resultado semelhante foi visto na subpopulação de monócitos intermediários expressando TNFR1+ e TNFR2+ e IL-10+ (Fig. E, H). A frequência da subpopulação CD14++CD16+CD120B+IL-10+ foi maior em CARD 2 quando comparado ao grupo CARD1 (Fig. 7H). Na subpopulação de monócitos não clássicos, esse mesmo perfil também foi verificado (Fig. 7I e J).

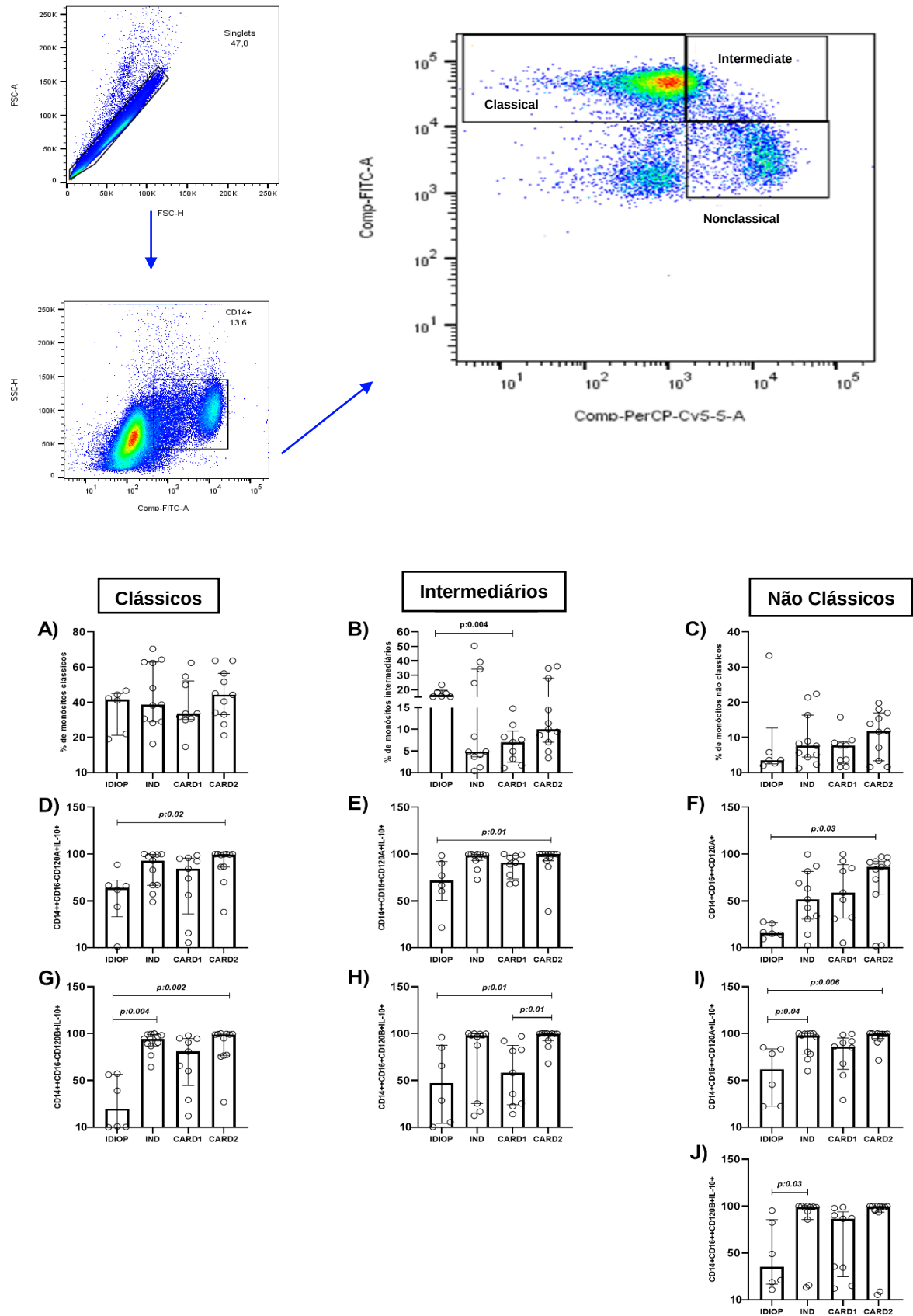


Figura 7. Estratégia de gate para seleção das subpopulações de monócitos, baseado na expressão de CD14 e CD16. Fig. A, D, G: expressão de receptores e citocinas em monócitos clássicos. Fig. B, E, H: expressão de receptores e citocinas em monócitos intermediários. Fig. C, F, I, J: expressão de receptores e citocinas em monócitos não clássicos. Barras indicam valores da mediana

3.4 Correlações

3.4.1 Correlação entre população de células expressando TNFR1 e TNFR2 e citocinas com a FEVE

Linfócitos TCD8+ expressando TNFR1 tem correlação positiva com o dano cardíaco, enquanto se correlaciona negativamente na forma indeterminada

Inicialmente correlacionamos todas as populações de células estudadas expressando receptores e citocinas com o % FEVE. Na forma IND, a frequência de Linfócitos TCD8+ expressando TNFR1 se correlacionaram negativamente com %FEVE ($r:-0.07$) (Fig. 8A), além disso monócitos totais expressando TNFR2 e TNF diminuem à medida que a %FEVE aumenta ($r:-0.77$) (Fig. 8B).

Na forma CARD1 células CD16+ expressando TNFR2 e IL-10 também apresentam correlação negativa com %FEVE ($r:-0.82$) (Fig.8C). De forma semelhante, monócitos intermediários expressando TNFR1 e IL-10 diminuem à medida que %FEVE aumenta ($r:-0.73$) (Fig. 8D).

Já em portadores cardíacos graves, a população de Linfócitos TCD8+ expressando TNFR1 se correlacionou positivamente ao %FEVE ($r:0.76$), indicando dano cardíaco (Fig. 8E). Nesse mesmo grupo de pacientes, células CD16+ ($r:-0.82$) e monócitos clássicos (-0.77) se mostraram opostas ao dano, pois se correlacionaram negativamente (Fig. 8F, G).

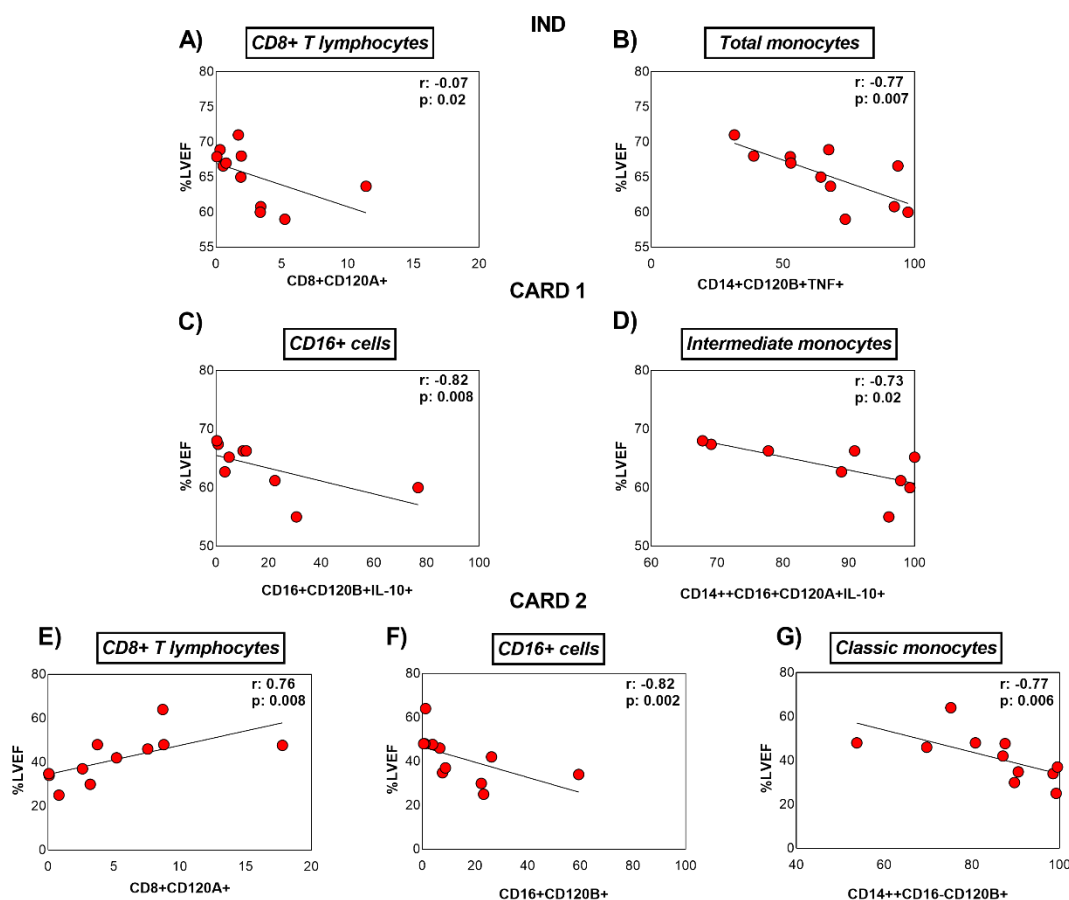


Figura 8. Correlação entre diferentes populações de células expressando receptores de TNF e percentual da fração de ejeção ventricular esquerda (%FEVE). r : rank de spearman.

3.4.2 Correlação entre células expressando TNF e TNFR nas diferentes formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Populações celulares com correlação de TNFR-TNF diferem totalmente entre a forma indeterminada e cardíaca, com exclusividade de subpopulações de monócitos no grupo CARD2.

Avaliamos a correlação do ligante, TNF, e de seus receptores nas diferentes populações celulares nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Curiosamente, observamos que na forma IND, Linfócitos TCD4+, Treg, Monócitos Totais e células CD16+ expressando diferentes receptores se correlacionam com o TNF (Fig. 9A, C, E e G). De modo contrário, essas populações celulares parecem

não estar relacionadas a interação TNFR-TNF, mas sim todas as subpopulações de monócitos em portadores cardíacos (CARD1 e CARD2) (Fig. 9B, D, F e H).

Ao avaliar a correlação isolada de cada receptor (TNFR1 vs TNF ou TNFR2 vs TNF). Observamos uma correlação positiva entre TNF e TNFR1 em linfócitos CD4+ ($r: 0.65$) e monócitos totais ($r: 0.69$) na forma indeterminada (Fig. 9A, E). Em contrapartida, foi observado uma correlação negativa em células T reg ($r: -1.0$) e CD16+ (-0.78) com o TNF, pela expressão de TNFR1 e TNFR2, respectivamente (Fig. 9C e G).

Já na forma cardíaca (CARD1 e CARD2), TNFR2 aumenta à medida que TNF aumenta em monócitos clássicos e intermediários (Fig. 9B, D e F). Diferentemente, a população de monócitos não clássicos expressando TNFR1 parece impactar negativamente níveis de TNF nessas células provenientes do grupo CARD2 (Fig. 9H).

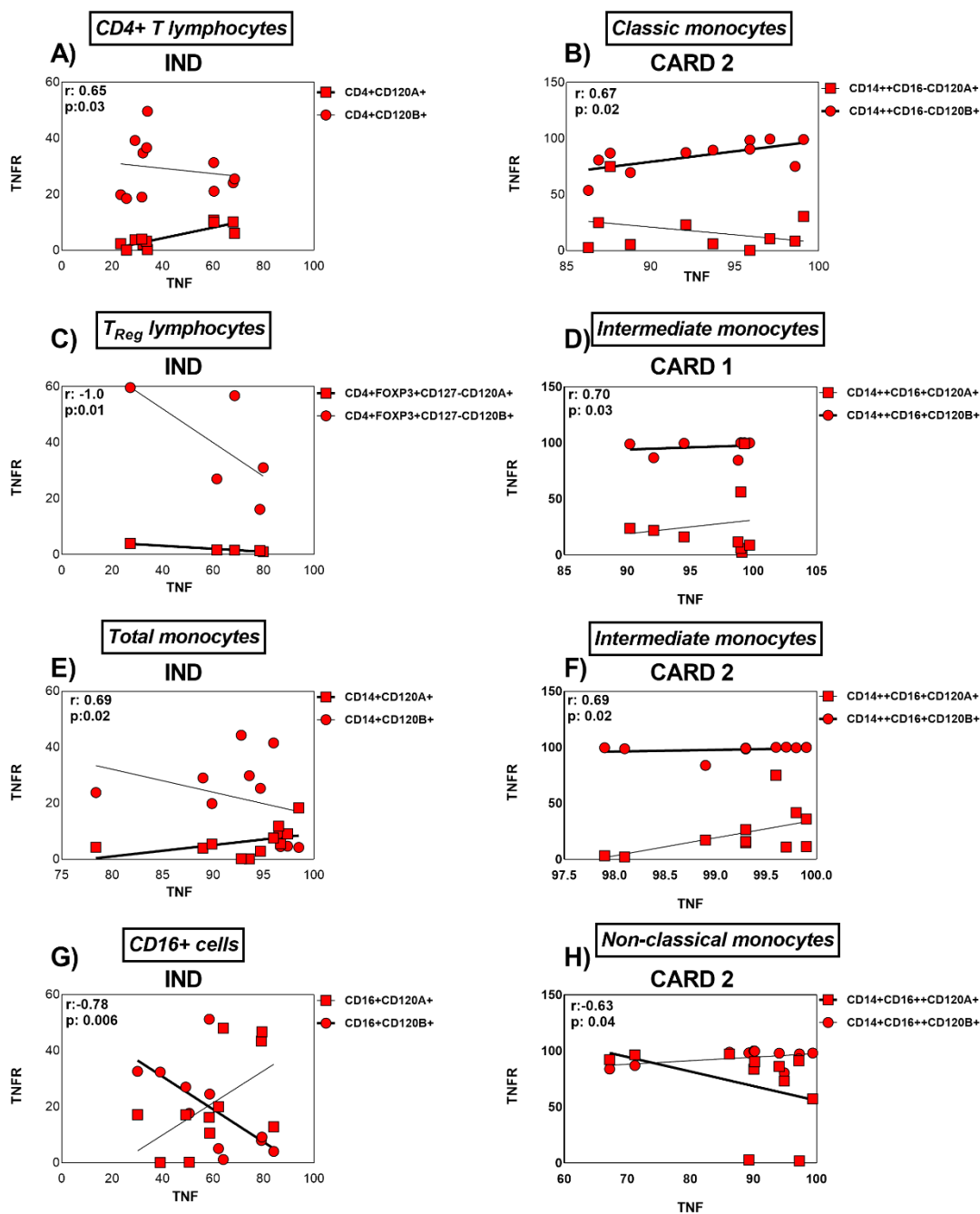


Figura 9. Correlação entre receptores de TNF em diferentes populações celulares e o TNF. Seta em negrito indica o receptor significativamente estatístico. R: rank de spearman

3.4.3 Correlação de TNFR1 e TNFR2 em diferentes populações de células por grupo

Foi realizada a correlação TNFR1 vs TNFR2 para verificar possível interação entre os receptores. Os dados sugerem correlação estatística significativa somente em populações de células CD14+ e de CD16+ na forma IND e CARD1. Na forma

IND, à medida que o TNFR1 aumenta, a frequência de TNFR2 diminui, sendo, portanto, uma correlação negativa ($r: -0.72$) (Fig. 10A). Em contrapartida, nessa mesma população de células, esses receptores se correlacionaram positivamente na forma CARD1 assim como em células CD16+ (Fig. 10B e C).

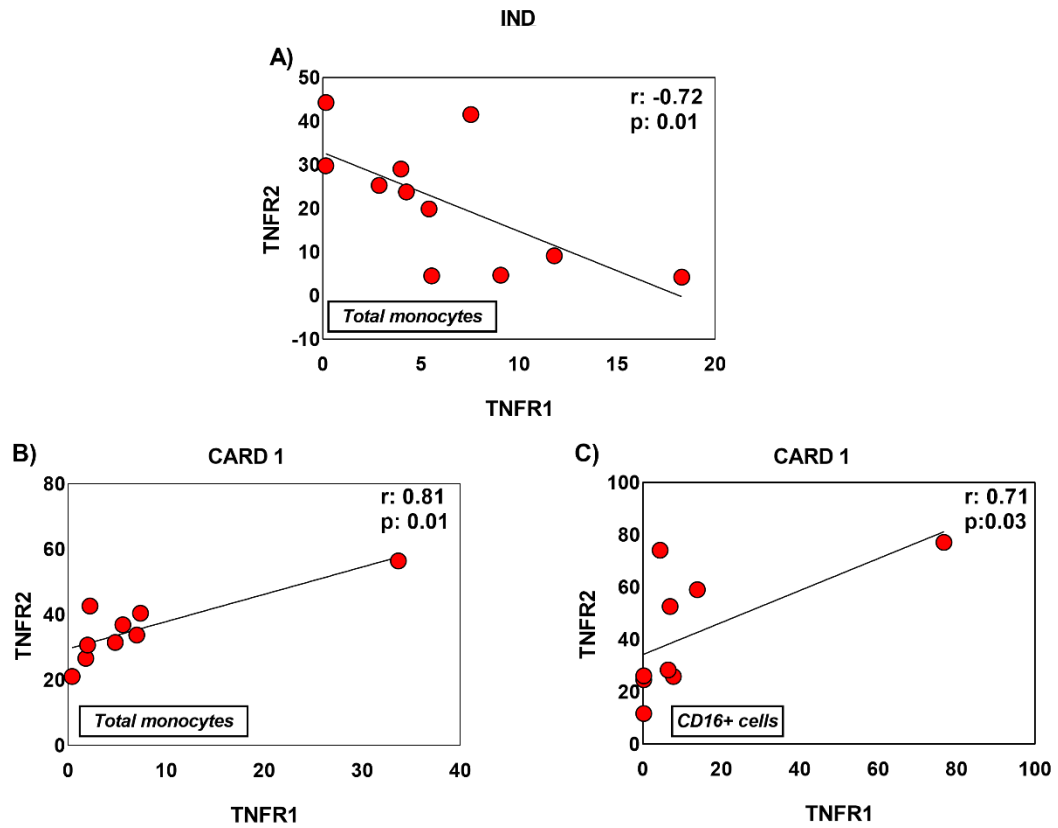


Figura 10. Correlação entre os receptores de TNF em populações de células. R: rank de spearman

DISCUSSÃO

A resposta imune na doença de Chagas tem relação com a carga parasitária, vias de infecção, fatores de virulência do parasita, do hospedeiro e influência de fatores neuroendócrinos (MORROT et al., 2016), podendo ser benéfica no início da infecção e relacionada com controle da parasitemia, mas com prejuízos evidentes em portadores crônicos sintomáticos, sobretudo com a forma cardíaca. Após a invasão do parasita e interação com as células, há uma forte ativação da resposta imune inata e adaptativa, que juntas atuam, mas não são suficientes para eliminação completa do *T. cruzi*. Este protozoário adquiriu vários mecanismos de evasão do sistema imunológico em decorrência de uma extensa história de coevolução entre parasita-hospedeiro (ACEVEDO, GIRARD, GÓMEZ, 2018), permanecendo muitos aspectos ainda não esclarecidos.

Muitos estudos demonstram a participação de uma ampla variedade de perfis celulares tanto da resposta imune inata: monócitos e células NK, quanto células da resposta imune adaptativa, como Linfócitos T e relação dessas células com formas clínicas. Além disso, análises de perfis de citocinas pró e anti-inflamatório sugerem que a IL-10 está mais elevada em indivíduos com a forma IND quando comparada aos da forma CARD, sugerindo que esta citocina esteja controlando a morbidade da doença por impedir a progressão para as formas clínicas sintomáticas (ARAÚJO et al., 2011; COSTA et al., 2009; GOMES et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2012; SOUZA et al., 2004).

Em contrapartida, citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α estão em níveis mais elevados em portadores da forma cardíaca e possivelmente, representam piora da função cardíaca (GUEDES et al., 2016; TALVANI et al., 2004). O TNF é produzido por uma diversidade de células imunes e não imunes, sendo a primeira citocina a ter seus níveis aumentados minutos após qualquer lesão (MONACO et al., 2014). Devido a sua comprovada participação na imunopatologia chagásica, buscamos compreender e avaliar a expressão dos receptores de TNF, TNFR1 e TNFR2 em células da imunidade inata, como monócitos totais e suas subpopulações, além de células CD16⁺ e células da resposta imune adaptativa, como Linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e T regulatórios provenientes de portadores crônicos com diferentes graus de acometimento cardíaco no contexto *ex vivo*.

Nossos dados sugerem um aumento na expressão de TNF por linfócitos TCD4+ e TCD8+ na forma cardíaca grave quando comparado a forma cardíaca leve. Apesar dos monócitos serem importantes fontes de TNF, a população de monócitos clássicos e intermediários, tem níveis mais baixos de TNF na forma cardíaca (leve e grave) quando comparado ao grupo de cardiopatas sem chagas e forma indeterminada. Esses dados reforçam que mesmo sendo os monócitos importantes fontes de TNF, são os Linfócitos TCD4 e TCD8, principais responsáveis pelo dano ao coração.

Comparamos a expressão dos receptores TNFR1 e TNFR2, por células e por grupo (Fig. 1,2 e 4). Como já descrita na literatura, o TNFR1 tem uma frequência mais baixa, sendo encontrado constitutivamente na maioria das células, porém o TNFR2 tem expressão muito mais restrita à células imunes, como Monócitos, Linfócitos Treg (levando a uma estimulação dessa subpopulação de células) além de células endoteliais e neurônios (CARPENTIER; COORNAERT; BEYAERT, 2004),

Na forma IND, a frequência de TNFR1 foi maior em células CD16+ quando comparada a T reg e TCD8+. De maneira contrária há uma mudança no percentual entre TNFR1 e TNFR2 na forma cardíaca grave (CARD2). Onde a frequência de TNFR2 em linfócitos TCD8+ foi maior quando comparada a população de CD14+ e CD16+. Além disso, verificamos que Linfócitos TCD4+CD120B+ aumenta em portadores CARD1 quando comparado ao grupo IND.

O TNFR1 contém um domínio de morte e tem sido relacionado a mecanismos apoptóticos e pró-inflamatórios quando ligado ao TNF. Enquanto o TNFR2 está associado com mecanismos regulatórios. O TNFR2 não tem domínio de morte, mas pode induzir indiretamente a morte celular via TNFR1, pela passagem do ligante em que o TNF se liga ao TNFR1 (TARTAGLIA *et al.*, 1993a, 1993b). Este receptor forma um complexo intracelular com o fator associado ao receptor de TNF (TRAF) (REDDY *et al.*, 2000). Este receptor está mais associado com efeitos homeostático como sobrevivência celular e regeneração de tecidos. Nossos resultados mostram que há uma expressão desregulada desse receptor em portadores da forma cardíaca, e que pode estar acontecendo o processo “passagem de ligante” (TARTAGLIA *et al.*, 1993a, 1993b; ANDERTON *et al.*, 2020).

Em camundongos deficientes de TNFR2 a capacidade proliferativa de células TCD4+ e TCD8+ foi prejudicada levando a diminuição da produção de citocinas inflamatórias (KIM *et al.*, 2006; 2008). Em nosso estudo, verificamos que Linfócitos

TCD4+ e Linfócitos TCD8+ expressando TNFR1 e TNFR2 e TNF aumentaram em portadores CARD2 quando comparado aos CARD1. Parece não haver distinção entre mecanismos inflamatórios e regulatórios desempenhados por esses receptores nesses pacientes. Ainda que Linfócitos TCD8+ expressando TNFR2 esteja diminuído na forma IND, parece haver algum mecanismo compensatório, já que houve aumento intracitoplasmático de IL-10 no grupo CARD2 quando comparado ao CARD1 e IDIOP (controle usado para comparação de cardiopatia grave, já que possuem percentual de FEVE semelhantes).

Percentual de Linfócitos TCD8+ TNFR1+ está associado ao dano cardíaco (através do percentual da FEVE) em portadores cardíacos graves, enquanto estas células se correlacionaram negativamente na forma IND, o que sugere, que de fato linfócitos TCD8+TNFR1+ está implicada pelo dano no coração.

Verificamos que a população de Linfócitos TCD4+ e monócitos totais expressando TNFR1 se correlacionou positivamente com os níveis de TNF intracitoplasmático na forma IND, e este mecanismo de ativação de TNF/TNFR1 parece ser importante já na fase indeterminada da doença, diferentemente das outras populações celulares, onde ocorreu uma correlação negativa entre TNFR1 e TNF. Nosso grupo demonstrou que receptores solúveis do tipo 1 (sTNFR1) se correlacionou negativamente com níveis de TNF solúveis na forma IND (TORRES et al., 2022). E a partir desses dados concluímos que algumas células de fato podem contribuir para a patogênese cardíaca.

Nesse estudo, avaliamos os receptores em células da resposta imune inata, como os monócitos. Dividimos em monócitos totais (CD14+) e suas subpopulações. Os monócitos são importantes células durante o processo inflamatório, pois ao serem recrutados por diferentes estímulos tais quais, citocinas pró-inflamatórias se diferenciam em macrófagos e atuam na eliminação de micro-organismos, porém podem desempenhar atividades prejudiciais aos tecidos, uma vez que são fontes de espécies reativas de oxigênio (BELGE et al., 2002; LUNA-GOMES et al., 2014; PINTO et al., 2018)

Verificamos que o percentual de Monócitos CD14+TNFR2+ está diminuída na forma cardíaca grave, mas assim como Linfócitos TCD4+ e TCD8+, a frequência dessa população de células aumentou na forma CARD2, o que pode sugerir que várias populações celulares estejam hiper-responsivas ao TNF e juntas contribuem para a imunopatologia. Já na forma IND, a população de monócitos CD14+TNFR1+

também se correlacionou positivamente com os níveis de TNF. Esses achados parecem reforçar que na fase assintomática, monócitos parecem contribuir com algum tipo de progressão clínica, pois ao correlacionarmos ambos os receptores, verificamos que enquanto se correlacionam negativamente na forma IND, na forma cardíaca a correlação é positiva. Ainda que essa população não se correlacione ao dano cardíaco, pela correlação com o %FEVE, parecem estar interagindo com outras células, sobretudo Linfócitos T.

Quando avaliamos a expressão dos receptores por células, a população de células CD16+ TNFR1+ está aumentada quando comparada as células T reg em portadores CARD2 e IND. Mas essa frequência muda com relação ao TNFR2. É evidente a mudança de expressão de TNFR1 e TNFR2 por células CD16+ em portadores CARD2. O que também é notado na análise feita por grupo de pacientes, onde células CD16+TNFR2+ estão diminuídas em portadores CARD2 quando comparados aos CARD1 e IDIOP. De maneira contrária, a população dessas células expressando TNFR1 e TNF diminuiu em portadores que tinha a forma CARD1 quando comparada a todos os outros grupos de pacientes. Ao correlacionar os receptores, TNFR1 vs TNFR2, verificamos uma correlação negativa entre TNFR2 e TNF na forma IND. Apesar desses achados, essa população de células não tem relação com o dano cardíaco, evidenciados pela associação ao %FEVE.

As subpopulações de monócitos expressam diferentemente moléculas CD14 e CD16, sendo classificados em clássicos (CD14++CD16-), intermediários (CD14++CD16+) e não clássicos (CD14+CD16++). Com funções distintas essas subpopulações estão sendo cada vez mais estudadas na imunopatologia chagásica. Curiosamente, ao avaliarmos as subpopulações de monócitos entre o grupo de pacientes, apenas a subpopulação de monócitos intermediários apresentou diferença estatística, com diminuição no grupo CARD1 quando comparado ao grupo IDIOP. Esta subpopulação também é conhecida como monócitos inflamatórios e está envolvida com mecanismos de angiogênese. PEREZ-MAZLIAH et al., (2018) verificaram um aumento na população de monócitos não clássicos em CARD1 e cardiopatia não chagásica (PEREZ-MAZLIAH et al., 2018; PINTO et al., 2018; GOMEZ-OLARTE et al., 2019).

Ao avaliar a expressão dessas subpopulações de monócitos expressando receptores de TNF, observamos diferenças somente na população de monócitos não clássicos, onde observamos aumento da expressão de TNFR1 nessas células

no grupo CARD2 quando comparado ao IDIOP. Monócitos não clássicos tem relação com patrulhamento e potente função anti-inflamatória (REF) e....

Com relação a produção de citocinas, não encontramos diferenças na produção de TNF, mas sim de IL-10 em todas as subpopulações com tendencias similares de produção expressando os diferentes receptores.

Para nossa surpresa, a frequência de TNFR1 foi maior na população de monócitos não clássicos em todas as formas clínicas, enquanto a expressão de TNFR2 foi maior em monócitos intermediários. O que de fato comprova a complexidade da imunologia na doença de chagas. Parece haver uma disfunção nesses receptores nessas células (ACEVEDO; GIRARD; GÓMEZ et al., 2018).

Ainda assim essas populações celulares não se correlacionam com o dano cardíaco. As correlações entre TNFR e TNF mostram que na forma cardíaca à medida que aumenta o TNFR2 aumenta TNF em populações de monócitos clássicos e intermediários. Já em monócitos não clássicos, a diminuição de TNF se correlaciona com aumento de TNFR1, podendo, de fato o TNFR2 sendo importante receptor de TNF e passando a citocina para o TNFR2 através da passagem de ligante. (TARTAGLIA et al., 1993a,1993b)

As células T reguladoras tem função crucial no sistema imunológico pois além de ter relação com mecanismos de tolerância, reconhecendo autoantígenos, também participa na modulação de outras células, diminuindo a atividade de células T com potencial patogênico ou danoso ao hospedeiro via IL-10 e TGF- β . No contexto da doença de chagas e diante de todo o exposto, essa população de linfócitos está aumentada em portadores assintomáticos quando comparado aos sintomáticos sobretudo a forma cardíaca (VITELLI-AVELAR et al., 2005; SILVEIRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012; ARAÚJO et al., 2011).

Nossos resultados apontam um aumento de Linfócitos T regulatórios em portadores CARD2 enquanto a população expressando TNFR1 está diminuída em comparação ao grupo IND. As células T reg parecem influenciar de alguma forma a expressão de TNFR1, comprovado pela correlação negativa entre TNFR1 e TNF na forma IND. Foi demonstrado que TNFR2 é crítico para a função supressiva de Tregs humanos e de camundongos (MOATTI; COHEN, 2021). Não encontramos correlação entre TNFR1 e TNFR2 em células Treg.

Esse estudo é pioneiro na avaliação desses receptores em diferentes células da resposta imune inata e adaptativa da doença de Chagas em diferentes formas

clínicas. Nossos achados revelam que TNFR1 tem associação ao dano cardíaco por linfócitos TCD8+, mas que TNFR2 também atua nesses portadores. Diante da complexidade da resposta imune na doença de Chagas, pode estar acontecendo a passagem de ligante do TNF para TNFR1. Estudos mais detalhados envolvendo o bloqueio desses receptores por drogas anti-TNF nessas células devem ser estimulados.

REFERÊNCIAS

Acevedo, G.R., Girard, M.C., Gómez, K.A., 2018. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. *Front. Immunol.* 9, 1929.

Aderka D, Engelmann H, Maor Y. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med.* 1992 Feb 1;175(2):323-9. doi: 10.1084/jem.175.2.323. PMID: 1310100; PMCID: PMC2119112.

Aliberti, J.C.S., Souto, J.T., Marino, A.P.M.P., et al., 2001. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ - and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 158, 1433–1440.

ARAÚJO, F.F. de; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, M.O.C. 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**, [S.L.], v. 217, n. 8, p. 768-777, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.04.008>

BLACK, R. A. et al. Relaxed Specificity of Matrix Metalloproteinases (MMPS) and TIMP Insensitivity of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Production Suggest the Major TNF- α Converting Enzyme Is Not an MMP. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, NY, v. 225, n. 2, p.400-405, 1996

Carpentier I, Coornaert B, Beyaert R. Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2. *Curr Med Chem.* 2004 Aug;11(16):2205-12. doi: 10.2174/0929867043364694. PMID: 15279559.

Costa-Oliveira CND, Paiva-Cavalcanti M, Barros MDS et al. Outbreak of Chagas disease in Brazil: Validation of a molecular diagnostic method. *Exp Parasitol.* 2023 Apr; 247:108478. doi: 10.1016/j.exppara.2023.108478. Epub 2023 Jan 31. PMID: 36731642.

Dias JCP, Jr Ramos AN, Gontijo ED et al. 2nd Brazilian consensus on Chagas Disease, 2015. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(Suppl 1):3–60. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0505-2016>

Dutra WO, Menezes CAS, Villani FNA et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. 2009. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104 (1), 208–218.

Echavarría NG, Echeverría LE, Stewart M et al. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. Curr. Probl. Cardiol. 2021, 46, 100507

Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1- specific immune response. 2003 Infect. Immun. 71, 1185–1193

GONZÁLEZ, F. *et al.* Dysregulated Network of Immune, Endocrine and Metabolic Markers is Associated to More Severe Human Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Neuroimmunomodulation**, Basileia, v. 25, n. 3, p.119-128, 2018.

GUEDES, P. M. M. *et al.* Inflammation Enhances the Risks of Stroke and Death in Chronic Chagas Disease Patients. Plos Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 10, n. 4, p.1-18, 2016

Kroll-palhares, K., Silv'erio, J.C., Da silva, A.A., et al., 2008. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF- α blockade. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 103, 375–385.

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 [Internet]. 2003Apr;98(3):299–304. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000300002>

Magalhães LMD, Gollob KJ, Zingales B et al. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human-host interactions. Lancet Microbe. 2022 Sep;3(9):e711-e722. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00265-2. Epub 2022 Mar 10. PMID: 36058233

MORROT, Alexandre; VILLAR, Silvina R.; GONZÁLEZ et al. Evasion and Immuno-Endocrine Regulation in Parasite Infection: two sides of the same coin in chagas disease?. Frontiers In Microbiology, [S.L.], v. 7, n. 8, p. 0-0, 23 maio 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00704>.

MOSS, M. L. *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . Nature, Londres, v. 385, n. 6618, p.733-736, 1997.

Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. Lancet. 2018; 391:82–94.

PINTO, Bruna F.; MEDEIROS, Nayara I.; TEIXEIRA-CARVALHO, Andrea; et al. CD86 Expression by Monocytes Influences an Immunomodulatory Profile in Asymptomatic Patients with Chronic Chagas Disease. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, n. 8, p. 1-1, 12 mar. 2018. Frontiers Media SA.

<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00454>

SEDDER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Oxford, v. 25, n. 4, p. 453–472, 2014.

Torres DJL; Arruda TR; Barros MS et al. Is a negative correlation between sTNFR1 and TNF in patients with chronic Chagas disease the key to clinical progression? *Immunobiology*, [S.L.], v. 227, n. 1, p. 152166, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152166>

Van Zee, K.J., Kohno, T., Fischer, E., Rock, C.S., Moldawer, L.L., Lowry, S.F., 1992. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *PNAS* 89, 4845–4849.

Villar, S.R., Ronco, M.T., Bussy, R.F., et al., 2013. Tumor necrosis factor- α regulates glucocorticoid synthesis in the adrenal glands of *Trypanosoma cruzi* acutely-infected mice. The role of TNF-R1. *PLoS ONE* 8, 1–13.

WHO. Chagas Disease in Latin America: An Epidemiological Update Based on 2010 Estimates. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2015, 90, 33–43.

7 CONCLUSÃO

- TNF atua na patogênese cardíaca através do seu aumento tanto em células quanto em sobrenadante de cultura de portadores com a forma cardíaca grave;
- Linfócitos TCD4+ e TCD8+ são células principais envolvidas na produção de TNF em portadores com a forma cardíaca grave;
- Em portadores com a forma cardíaca grave há uma desregulação na resposta imune, com predomínio de uma resposta Th1, por TNF sobre Th2 com diminuição de IL-4;
- TNF é uma citocina pleiotrópica, pois seu bloqueio com Adalimumabe e Etanercepte resultou na alteração de todas as citocinas do perfil inflamatório e regulatório;
- Os efeitos dos bloqueadores de TNF variaram entre os grupos de pacientes, indicando que a gravidade da cardiopatia chagásica influencia a resposta imunológica. O Alimumabe e Etanercepte apresentaram impacto significativo na redução do TNF, sobretudo no grupo com cardiopatia grave (CARD2), o que pode sugerir que a utilização de bloqueadores de TNF pode ser mais benéfica em estágios mais avançados da doença.
- A combinação de bloqueadores de TNF com Benzonidazol mostra potencial para modular a resposta imunológica, indicando uma possível abordagem terapêutica mais ampla no futuro, ampliando as opções de tratamento em um cenário onde as opções são limitadas.
- A dinâmica de produção de receptores em células não reflete a nível sorológico, pois receptores solúveis de TNF, sTNFR1 e sTNFR2, apesar de estarem aumentados em portadores crônicos da doença de Chagas, não tem diferenças com relação as formas clínicas;
- TNFR1 e TNFR2 tem expressão aumentada em diversos tipos celulares da resposta imune inata e adaptativa provenientes de portadores com doença de Chagas crônica;
- Linfócitos TCD8 expressando TNFR1 podem estar intimamente ligado ao dano cardíaco e à progressão da doença.

- As associações observadas entre frequência de receptores/citocinas e a gravidade da doença indicam potenciais alvos terapêuticos e marcadores prognóstico

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, Gonzalo R.; GIRARD, Magalí C.; GÓMEZ, Karina A. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Frontiers In Immunology*, usa, v. 9, n. 8, p. 1-23, 24 ago. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>.

ADERKA, D; ENGELMANN, H; MAOR, Y; BRAKEBUSCH, C; WALLACH, D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. **The Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 175, n. 2, p. 323-329, 1 fev. 1992. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.175.2.323>.

ALBAREDA, María C.; RISSIO, Ana M. de; TOMAS, Gonzalo; SERJAN, Alicia; ALVAREZ, María G.; VIOTTI, Rodolfo; FICHERA, Laura E.; ESTEVA, Mónica I.; POTENTE, Daniel; ARMENTI, Alejandro. Polyfunctional T Cell Responses in Children in Early Stages of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection Contrast with Monofunctional Responses of Long-term Infected Adults. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 2575-1, 12 dez. 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002575>.

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*, Nova Iorque, v. 158, n. 4, p.1433-1440, 2001.

ALVES, Sílvia Marinho Martins; SILVA, Bárbara Mariana dos Santos; BARBOSA, Esthefany Dias; MEDEIROS, Carolina de Araújo; BARROS, Maria das Neves Dantas da Silveira; CAVALCANTI, Maria da Glória Aureliano de Melo; ASSUNÇÃO, Maria Elisa Lucena Sales de Melo; LORENA, Virginia Maria Barros de; ALBUQUERQUE, Afonso Luiz Tavares de; LUCENA, Renata Amorim de. Advances in Clinical Practice, Diagnosis and Treatment of Chronic Chagas' Heart Disease. *Abc Heart Fail Cardiomyop*, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-1, jun. 2023. Sociedade Brasileira de Cardiologia. <http://dx.doi.org/10.36660/abchf.20230029>

ANDERTON, Holly; WICKS, Ian P.; SILKE, John. Cell death in chronic inflammation: breaking the cycle to treat rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*, [S.L.], v. 16, n. 9, p. 496-513, 8 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41584-020-0455-8>

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W, O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, n. 7, p. 3010-3010, 2014.

ARAÚJO, F.F. *et al.* Regulatory T Cells Phenotype in Different Clinical Forms of Chagas' Disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 5, n. 5, p.1-8, 2011.

ARAÚJO, F.F. de; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, M.O.C.; CHAVES, A.T.; FIUZA, J.A.; FARES, R.C.G.; FERREIRA, K.s.; NUNES, M.C.P.; KEESEN, T.s.; DAMASIO, M.P.s.. 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**, [S.L.], v. 217, n. 8, p. 768-777, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2012.04.008>

ARGOLO, A. M. *et al.* **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro. Imperial Novo Milênio, 2008.

BAFICA, Andre; SANTIAGO, Helton Costa; GOLDSZMID, Romina; ROPERT, Catherine; GAZZINELLI, Ricardo T.; SHER, Alan. Cutting Edge: tlr9 and tlr2 signaling together account for myd88-dependent control of parasitemia in trypanosoma cruzi infection. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 177, n. 6, p. 3515-3519, 15 set. 2006. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3515>.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R.H.. Acute and Congenital Chagas Disease. In: WEISS, Louis M.; TANOWITZ, Herbert B.; KIRCHHOFF, Louis V. (Ed.). **Chagas Disease, Part A**. Londres: Elsevier, 2011. Cap. 2. p. 19-47.

BILATE, A.M.B. *et al.* TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Microbes And Infection**, Paris, v. 9, n. 9, p.1104-1113, 2007.

BILBE, G. Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. **Science**, Washington, v. 348, n. 6238, p.974-976, 2015.

BLACK, R. A. *et al.* Relaxed Specificity of Matrix Metalloproteinases (MMPS) and TIMP Insensitivity of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Production Suggest the Major TNF- α Converting Enzyme Is Not an MMP. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 225, n. 2, p.400-405, 1996.

BOCCHI, E. A. *et al.* Chronic Chagas Heart Disease Management. **Journal of the American College of Cardiology**, Nova Iorque, v. 70, n. 12, p. 1510–1524, 2017.

BODMER, Jean-Luc; SCHNEIDER, Pascal; TSCHOPP, Jürg. The molecular architecture of the TNF superfamily. **Trends In Biochemical Sciences**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 19-26, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01995-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01995-8)

BONNEY, Kevin M.; ENGMAN, David M.. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **The American Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 185, n. 6, p. 1537-1547, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.023>

BRASIL. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016, Brasília, v. 50, n. 2, p. 1-10, 2019.

Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T.. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease. *International Archives of Allergy and Immunology*, Basileia, v. 114, n. 2, p.103-110, 1997.

BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETO, M. Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 10, p. 170-176. 2000.

BROEDER, A A Den. Long term anti-tumour necrosis factor alpha monotherapy in rheumatoid arthritis: effect on radiological course and prognostic value of markers of cartilage turnover and endothelial activation. ***Annals Of The Rheumatic Diseases***, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 311-318, 1 abr. 2002. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.61.4.311>.

CAETANO, Braulia C.; CARMO, Bianca B.; MELO, Mariane B.; CERNY, Anna; SANTOS, Sara L. dos; BARTHOLOMEU, Daniella C.; GOLENBOCK, Douglas T.; GAZZINELLI, Ricardo T.. Requirement of UNC93B1 Reveals a Critical Role for TLR7 in Host Resistance to Primary Infection with *Trypanosoma cruzi*. ***The Journal Of Immunology***, [S.L.], v. 187, n. 4, p. 1903-1911, 15 ago. 2011. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003911>.

CARDILLO F, VOLTARELLI JC, REED SG, SILVA JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun*. (1996) 64:128–34

CARDILLO, Fabiola; POSTOL, Edilberto; NIHEI, Jorge; AROEIRA, Luiz S.; NOMIZO, Auro; MENGEL, José. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. ***Immunology***, [S.L.], v. 122, n. 4, p. 584-595, dez. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02677.x>.

CARPENTIER, I.; COORNAERT, B.; BEYAERT, R. Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2. ***Current medicinal chemistry***, Schiphol, v. 11, n. 16, p. 2205–2212, 2004.

CARSWELL, E.A. *et al*. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. ***Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America***, Washington, v.72, n. 9, p. 3666–3670, 1975.

CASTAÑOS-VELEZ *et al*. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. ***Infection and Immunity***, Washington, v. 66, n. 6, 2960-2968, 1998.

CASTRO, I. *et al*. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. ***Arquivos Brasileiros de Cardiologia***, São Paulo, v. 97, n. 2, p. 01-48, 2011.

CHAVES, A.T. *et al.* Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. *Bmc Infectious Diseases*, Londres, v. 16, n. 1, p.1-11, 2016.

COLEY, William B.. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). **Proceedings Of The Royal Society Of Medicine**, [S.L.], v. 3, n. , p. 1-48, jun. 1910. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/003591571000301601>

COSTA, G.C. *et al.* Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated with Chagas Disease Cardiomyopathy. *The Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 199, n. 3, p.451-454, 2009.

COSTA-OLIVEIRA, Cíntia Nascimento da; PAIVA-CAVALCANTI, Milena de; BARROS, Michelle da Silva; NAKAZAWA, Mineo; MELO, Maria Gabriella Nunes de; PESSOA-E-SILVA, Rômulo; TORRES, Diego José Lira; OLIVEIRA, Kamila Kássia dos Santos; MOREIRA, Leyllane Rafael; MORAIS, Rayana Carla Silva de. Outbreak of Chagas disease in Brazil: validation of a molecular diagnostic method. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 247, p. 108478, abr. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108478>.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, Basileia, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.

CUELLAR, A. *et al.* Natural CD4+ T-cell responses against *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chronic chagasic patients. *Immunology and Cell Biology*, Adelaide, v. 87, n. 2, p.149-153, 2008.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Cardiac Gene Expression Profiling Provides Evidence for Cytokineopathy as a Molecular Mechanism in Chagas' Disease Cardiomyopathy. *The American Journal of Pathology*, Nova Iorque, v. 167, n. 2, p.305-313, 2005.

CUNHA-NETO, Edecio; TEIXEIRA, Priscila C.; FONSECA, Simone G.; BILATE, Angelina M.; KALIL, Jorge. Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. **Autoimmunity Reviews**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 163-165, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2010.09.019>.

DEROUICH-GUERGOUR *et al.* Tumour necrosis factor α receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. **International Journal For Parasitology**, Nova Iorque, v. 31, n. 8, 763-769, 2001.

DIAS, J.C.P. Doença de Chagas em Bambuí - Minas Gerais. Brasil. Estudo Clínico-Epidemiológico a partir da fase aguda entre 1940 e 1982. 376 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, 1982.

DIAS, J.C.P. Chagas disease: still a challenge around the World. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 48, n. 4, p.367-369, 2015.

DIAS, J.C.P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 25, n. 21, p.1-10, 2016.

DIAS, J.C.P; AMATO NETO, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *trypanosoma cruzi* no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 68-72, 2011.

DOLASIA, Komal; BISHT, Manoj K; PRADHAN, Gourango; UDGATA, Atul; MUKHOPADHYAY, Sangita. TLRs/NLRs: shaping the landscape of host immunity. **International Reviews Of Immunology**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 3-19, dez. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08830185.2017.1397656>.

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, n. 1, p.74-80, 1997.

DUTRA, Walderez O; GOLLOB, Kenneth J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion In Infectious Diseases**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 287-292, jun. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/qco.0b013e3282f88b80>

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

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O. C.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 581–587, 2005.

EVANGELATOS, Gerasimos; BAMIAS, Giorgos; KITAS, George D.; KOLLIAS, George; SFIKAKIS, Petros P.. The second decade of anti-TNF-a therapy in clinical practice: new lessons and future directions in the covid-19 era. **Rheumatology International**, [S.L.], v. 42, n. 9, p. 1493-1511, 3 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-022-05136-x>

FARES, R. C. G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; ARAËJO, F. F. de; KEESEN, T. S. L.; CHAVES, A. T.; FIUZA, J. A.; FERREIRA, K. S.; ROCHA, M. O. C.; GOMES, J. A. S.. Identification of phenotypic markers of B cells from patients with Chagas disease. **Parasite Immunology**, [S.L.], v. 35, n. 7-8, p. 214-223, jul. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12038>

FERNÁNDEZ, Esteban R.; OLIVERA, Gabriela C.; PALACIO, Luz P. Quebrada; GONZÁLEZ, Mariela N.; HERNANDEZ-VASQUEZ, Yolanda; SIRENA, Natalia María; MORÁN, María L.; PATIÑO, Oscar S. Ledesma; POSTAN, Miriam. Altered Distribution of Peripheral Blood Memory B Cells in Humans Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 8, p. 104951-1, 11 ago. 2014. Public

Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0104951>.

FERREIRA, R. C. *et al.* Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/ "indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p.407-412, 2003.

FERREIRA, Ludmila Rodrigues Pinto; FERREIRA, Frederico Moraes; NAKAYA, Helder Imoto; DENG, Xutao; CÂNDIDO, Darlan da Silva; OLIVEIRA, Lea Campos de; BILLAUD, Jean-Noel; LANTERI, Marion C; RIGAUD, Vagner Oliveira-Carvalho; SEIELSTAD, Mark. Blood Gene Signatures of Chagas Cardiomyopathy With or Without Ventricular Dysfunction. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 215, n. 3, p. 387-395, 17 dez. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw540>.

FIUZA, Jacqueline Araújo; FUJIWARA, Ricardo Toshio; GOMES, Juliana Assis Silva; ROCHA, Manoel Otávio das Costa; CHAVES, Ana Thereza; ARAÚJO, Fernanda Fortes de; FARES, Rafaelle Christine Gomes; TEIXEIRA-CARVALHO, Andrea; MARTINS-FILHO, Olindo de Assis; CANÇADO, Guilherme Grossi Lopes. Profile of Central and Effector Memory T Cells in the Progression of Chronic Human Chagas Disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 3, n. 9, p. 512-1, 9 set. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000512>.

GARCÍA, M. M. *et al.* Soluble Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors (sTNF-R1 and -R2) in Pregnant Women Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi* and their Children. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Illinois, v. 78, n. 3, p. 499-503, 2008.

GIRALDO, Nicolás A.; BOLAÑOS, Natalia I.; CUELLAR, Adriana; ROA, Nubia; CUCUNUBÁ, Zulma; ROSAS, Fernando; VELASCO, Víctor; PUERTA, Concepción J.; GONZÁLEZ, John M.. T Lymphocytes from Chagasic Patients Are Activated but Lack Proliferative Capacity and Down-Regulate CD28 and CD3ζ. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 2038-1, 31 jan. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002038>

GOMES, J. A. S. *et al.* Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. *Infection and Immunity*, Washington, v. 71, n. 3, p.1185-1193, 2003.

GONZÁLEZ, F. *et al.* Dysregulated Network of Immune, Endocrine and Metabolic Markers is Associated to More Severe Human Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Neuroimmunomodulation**, Basileia, v. 25, n. 3, p.119-128, 2018.

GRAUERT, M. R.; HOUDAYER, M.; HONTEBEYRIE-JOSKOWCIZ, M.. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clinical and Experimental Immunology*, Londres, v. 93, n.1, p.85-92, 1993.

GUEDES, P. M. M. *et al.* Inflammation Enhances the Risks of Stroke and Death in Chronic Chagas Disease Patients. *Plos Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 10, n. 4, p.1-18, 2016.

GUTIERREZ, F. R. S. *et al.* The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology*, Oxford, v. 31, n. 11, p.673-685, 2009.

HAWKING, S.W. Eutanásia - People Daily Online. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-43401664>> Acesso em: 23 de março de 2019

HOFT, Daniel F.; EICKHOFF, Chris S.. Type 1 Immunity Provides Both Optimal Mucosal and Systemic Protection against a Mucosally Invasive, Intracellular Pathogen. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 73, n. 8, p. 4934-4940, ago. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.73.8.4934-4940.2005>

HOTEZ, P.J. *et al.* The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 9, e300, 2008.

ISSUREE, P. D. A. *et al.* IRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. *Journal of Clinical Investigation*, Nova Iorque, v. 123, n. 2, p.1-5, 2013.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B.. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Rheumatology*, Londres, v. 12, n. 1, p.49-62, 2015.

KIM, H.L. *et al.* Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors and Arterial Stiffness in Patients with Coronary Atherosclerosis. *American Journal of Hypertension*, Nova Iorque, v. 30, n. 3, p.313-318, 2016.

KIRCHNER, Silvia; HOLLER, Ernst; HAFFNER, Silvia; ANDREESSEN, Reinhard; EISSNER, Günther. Effect of different tumor necrosis factor (TNF) reactive agents on reverse signaling of membrane integrated TNF in monocytes. **Cytokine**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 67-74, out. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2004.06.008>.

KROLL-PALHARES, K. *et al.* TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF- α blockade. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 4, p. 375-385, 2008.

LAIDLAW, Brian J.; CRAFT, Joseph E.; KAECH, Susan M.. The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 102-111, 19 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2015.10>.

LANNES-VIEIRA, Joseli. Trypanosoma cruzi-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 98, n. 3, p. 299-304, abr. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762003000300002>.

LANNES-VIEIRA, J. *et al.* TNF- α and TNFR in Chagas Disease: From Protective Immunity to Pathogenesis of Chronic Cardiomyopathy. In: WALLACH, David; KOVALENKO, Andrew; FELDMANN, Marc. *Advances in TNF Family Research*. Nova Iorque: Springer, New York, Ny, p. 221-230, 2009.

LETHABY, Anne; LOPEZ-OLIVO, Maria Angeles; MAXWELL, Lara J; BURLS, Amanda; TUGWELL, Peter; A WELLS, George. Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-1, 31 maio 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd004525.pub2>.

LIDANI, Kárita C. F. *et al.* The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p.1-14, 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>.

LIEKE T, GRAEFE SEB, KLAUENBERG U, FLEISCHER B, JACOBS T. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* Infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun.* (2004) 72:6817–25.

LOCKSLEY, Richard M.; KILLEEN, Nigel; LENARDO, Michael J.. The TNF and TNF Receptor Superfamilies. **Cell**, [S.L.], v. 104, n. 4, p. 487-501, fev. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00237-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00237-9)

LUNA-GOMES, Tatiana; FILARDY, Alessandra A.; ROCHA, Juliana Dutra B.; DECOTE-RICARDO, Debora; LAROCQUE-DE-FREITAS, Isabel Ferreira; MORROT, Alexandre; BOZZA, Patrícia T.; CASTRO-FARIA-NETO, Hugo C.; DOSREIS, George A.; NUNES, Marise P.. Neutrophils Increase or Reduce Parasite Burden in *Trypanosoma cruzi*-Infected Macrophages, Depending on Host Strain: role of neutrophil elastase. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 90582-0, 5 mar. 2014. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090582>.

MACHADO, F. S. *et al.* Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Frontiers in bioscience**, Tampa, v. 4, p. 1743–1758, 2012a.

MACHADO, F. S. *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis os Chagas disease. **Seminars in Immunopathology**, Berlim, v. 34, n. 6, p. 753–770, 2012b.

MACEWAN, D.J. TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences. **Cellular Signalling**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 477-492, 2002.

MAGALHÃES, L. M. D. *et al.* High Interleukin 17 Expression Is Correlated With Better Cardiac Function in Human Chagas Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 207, n. 4, p.661-665, 2012.

MAGALHÃES, L. M. D. *et al.* Distinct *Trypanosoma cruzi* isolates induce activation and apoptosis of human neutrophils. *Plos One*, San Francisco, v. 12, n. 11, p.1-17, 2017.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease. **Clinical Cardiology**, Nova Iorque, v. 38, n. 9, p. 565–569, 2015.

MARIN-NETO, J. A. *et al* . Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, Dallas, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 2007.

MATHIS, Diane; SHOELSON, Steven E.. Immunometabolism: an emerging frontier. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 81-83, 14 jan. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2922>.

MATTU, U. K. *et al*. The Assassin: Chagas Cardiomyopathy. *The American Journal of Medicine*, Nova Iorque, v. 126, n. 10, p.864-867, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, p. 1-29, 2005.

MITOMA, Hiroki; HORIUCHI, Takahiko; HATTA, Nobuaki; TSUKAMOTO, Hiroshi; HARASHIMA, Shin-Ichi; KIKUCHI, Yuji; OTSUKA, Junji; OKAMURA, Seiichi; FUJITA, Shigeru; HARADA, Mine. Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF- α . **Gastroenterology**, [S.L.], v. 128, n. 2, p. 376-392, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.060>.

MOCELIN, A. O. *et al*. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: A prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *European Journal of Heart Failure*, Nova Iorque, v. 7, n. 5, p.869-873, 2005.

MOHAMED-ALI, Vidya; GOODRICK, Steven; BULMER, Karen; HOLLY, Jeffrey M. P.; YUDKIN, John S.; COPPACK, Simon W.. Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue in vivo. **American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, [S.L.], v. 277, n. 6, p. 971-975, 1 dez. 1999. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.1999.277.6.e971>

MONACO, Claudia; NANCHAHAL, Jagdeep; TAYLOR, Peter; FELDMANN, Marc. Anti-TNF therapy: past, present and future. **International Immunology**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 55-62, 19 nov. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxu102>

MONDEN, Y. *et al*. Tumor necrosis factor- is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Bethesda, v. 293, n. 1, p.743-753, 2007.

MORROT, Alexandre; VILLAR, Silvina R.; GONZÁLEZ, Florencia B.; PÉREZ, Ana R.. Evasion and Immuno-Endocrine Regulation in Parasite Infection: two sides of the same coin in chagas disease?. *Frontiers In Microbiology*, [S.L.], v. 7, n. 8, p. 0-0, 23 maio 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00704>

MOSS, M. L. *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, Londres, v. 385, n. 6618, p.733-736, 1997.

NÓBREGA, A. A. *et al.* Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 15, n. 4, p.653-655, 2009.

VAN OVERTVELT L, VANDERHEYDE N, VERHASSELT V, ISMAILI J, DE VOS L, GOLDMAN M, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun.* (1999) 67:4033–40.

PARK, M. *et al.* Associations of tumor necrosis factor alpha receptor type 1 with kidney function decline, cardiovascular events, and mortality risk in persons with coronary artery disease: Data from the Heart and Soul Study. *Atherosclerosis*, Amsterdã, v. 263, p.68-73, 2017.

PEREIRA, I. R. *et al.* Tumor Necrosis Factor Is a Therapeutic Target for Immunological Unbalance and Cardiac Abnormalities in Chronic Experimental Chagas' Heart Disease. *Mediators of Inflammation*, Nova Iorque, v. 2014, p.1-16, 2014.

PÉREZ, A. R. *et al.* Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain, Behavior, And Immunity*, San Diego, v. 21, n. 7, p.890-900, 2007.

PÉREZ, A. R. *et al.* Short treatment with the tumour necrosis factor- α blocker infliximab diminishes chronic chagasic myocarditis in rats without evidence of *Trypanosoma cruzi* reactivation. *Clinical & Experimental Immunology*, Londres, v. 157, n. 2, p.291-299, 2009.

PÉREZ, A. R. *et al.* Death of adrenocortical cells during murine acute *T. cruzi* infection is not associated with TNF-R1 signaling but mostly with the type II pathway of Fas-mediated apoptosis. *Brain, Behavior, And Immunity*, San Diego, v. 65, p.284-295, 2017.

PEREZ-MOLINA, J.A; MOLINA, J. Chagas Disease. **The Lancet**, Londres, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2017.

PINHEIRO, E. *et al.* Chagas disease: Review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 50, n. 3, p. 296–300, 2017.

PINTO, Bruna F.; MEDEIROS, Nayara I.; TEIXEIRA-CARVALHO, Andrea; ELOI-SANTOS, Silvana M.; FONTES-CAL, Tereza C. M.; ROCHA, Débora A.; DUTRA, Walderez O.; CORREA-OLIVEIRA, Rodrigo; GOMES, Juliana A. S.. CD86 Expression by Monocytes Influences an Immunomodulatory Profile in Asymptomatic Patients with Chronic Chagas Disease. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, n. 8,

p. 1-1, 12 mar. 2018. **Frontiers Media SA.**
<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00454>

PIRCHER, J. *et al.* Prothrombotic effects of tumor necrosis factor alpha *in vivo* are amplified by the absence of TNF-alpha receptor subtype 1 and require TNF-alpha receptor subtype 2. **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v. 14, n. 5, 2012.

PITCOVSKY, Tamara A.; BUSCAGLIA, Carlos A.; MUCCI, Juan; CAMPETELLA, Oscar. A Functional Network of Intramolecular Cross-Reacting Epitopes Delays the Elicitation of Neutralizing Antibodies to *Trypanosoma cruzi* trans-Sialidase. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 186, n. 3, p. 397-404, ago. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/341463>

RAMÍREZ-TOLOZA, G.; FERREIRA, A.. *Trypanosoma cruzi* Evades the Complement System as an Efficient Strategy to Survive in the Mammalian Host: The Specific Roles of Host/Parasite Molecules and *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p.1-13, 2017. **Frontiers Media SA.**
<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01667>.

RASSI, A. *et al.* Clinical phases and forms of Chagas disease. In: TELLERIA, Jenny; TIBAYRENC, Michel. **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research**. 2. ed. Cambridge: Academic Press, 2017. p. 653-684.

RASSI Jr. A.; RASSI, A.; LITTLE, W.C. Chagas' Heart Disease. **Clinical Cardiology**, Nova Iorque, v.23, p. 883-889, 2000.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, Filadélfia, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, Londres, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RASSI A Jr, RASSI A, RASSI SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, Dallas, v.115, n: 9, p.1101-1108, 2007.

REDDY, Pranhitha; SLACK, Jennifer L.; DAVIS, Raymond; CERRETTI, Douglas Pat; KOZLOSKY, Carl J.; BLANTON, Rebecca A.; SHOWS, Donna; PESCHON, Jacques J.; BLACK, Roy A.. Functional Analysis of the Domain Structure of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 275, n. 19, p. 14608-14614, maio 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.19.14608>

RIBEIRO, A. L. *et al.* Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews. Cardiology**, Londres, v. 9, n. 10, p. 576–589, 2012.

RIBEIRO, A L.; ROCHA, M. O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 301–314, 1998.

RICHARDSON, P. *et al.* Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation*, Dallas, v. 93, n. 5, p.841-842, 1996.

ROBERTS, Nicholas J.; ZHOU, Shibin; DIAZ, Luis A.; HOLDHOFF, Matthias. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. **Oncotarget**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 739-751, 27 out. 2011. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.344>.

RODRIGUES, D. B. R. *et al.* In Situ Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells in Chagas' Disease Patients with Heart Failure. *Clinical And Developmental Immunology*, Abingdon, v. 2012, p.1-7, 2012.

RUTGEERTS, Paul; D'HAENS, Geert; TARGAN, Stephan; VASILIAUSKAS, Eric; HANAUER, Stephen B.; PRESENT, Daniel H.; MAYER, Lloyd; VAN HOGZAND, Ruud A.; BRAAKMAN, Tanja; DEWOODY, Kimberly L.. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 117, n. 4, p. 761-769, out. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70332-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70332-x).

SALTIEL, A. R.. New Perspectives into the Molecular Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Cell*, Cambridge, v. 104, n. 4, p.517-529, 2001.

SAFRANOW, K. *et al.* Plasma concentrations of TNF- α and its soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 in patients with coronary artery disease. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 74, n. 5, p.386-392, 2009.

SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E. M.; REIS, D. D.; MEDRANO-MERCADO, N.; ARAUJO-JORGE, T. C.; ANTAS, P. R. Z.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TRACEY, Kevin J.; CERAMI, Anthony. Metabolic Responses to Cachectin/TNF. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 587, n. 1, p. 325-331, jun. 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb00173.x>.

SETHI, Jaswinder K.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S.. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. **Nature Metabolism**, [S.L.], v. 3, n. 10, p. 1302-1312, 14 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s42255-021-00470-z>.

TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ELOI-SANTOS, S. M.; FAVATO, D.. Phenotypic Features of Peripheral Blood Leucocytes During Early Stages of Human Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 58, n. 6, p. 655-663, dez. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2003.01340.x>.

SATHLER-AVELAR, R. *et al.* 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. SUPPL. 1, p. 246–251, 2009.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, Basileia, v. 115, n. 1–2, p. 14–21,

2010.

SEDDER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 453–472, 2014.

SERRÁN, Melisa Gorosito; BOARI, Jimena Tosello; VERNENGO, Facundo Fiocca; BECCARÍA, Cristian G.; RAMELLO, María C.; BERMEJO, Daniela A.; COOK, Amelia G.; VINUESA, Carola G.; MONTES, Carolina L.; RODRIGUEZ, Eva V. Acosta. Unconventional Pro-inflammatory CD4+ T Cell Response in B Cell-Deficient Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 8, p. 0-0, 21 nov. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.01548>.

SILVA, Ana Paula Galvao da; JACYSSYN, Jacqueline F.; ABRAHAMSOHN, Ises de Almeida. Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. **Immunology**, [S.L.], v. 108, n. 2, p. 230-237, fev. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01571.x>.

SILVEIRA, Alexandre B.M. da; ARAËJO, Fernanda Fortes de; FREITAS, Michelle A. Ribeiro; GOMES, Juliana Assis Silva; CHAVES, Ana Thereza; OLIVEIRA, Enio C. de; G. NETO, Salustiano; LUQUETTI, Alejandro O.; SOUZA, Gilmar da Cunha; BERNARDINO JÚNIOR, Roberto. Characterization of the presence and distribution of Foxp3+ cells in chagasic patients with and without megacolon. **Human Immunology**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 65-67, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2008.10.015>

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**, Washington, v. 72, n. 9, p. 5283-5291, 2004.

SOUZA, P. E. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Infection Induces Differential Modulation of Costimulatory Molecules and Cytokines by Monocytes and T Cells from Patients with Indeterminate and Cardiac Chagas' Disease. **Infection And Immunity**, Washington, v. 75, n. 4, p.1886-1894, 2007.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges. **Global Heart**, Reino Unido, v. 10, n. 3, p. 139–144, 2015.

STOEP, D.F. van Breukelen-Van Der; KLOP, B.; VAN ZEBEN, D.; HAZES, J.M.W.; CABEZAS, M. Castro. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: how to lower the risk?. **Atherosclerosis**, [S.L.], v. 231, n. 1, p. 163-172, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.006>

TALVANI, A. *et al.* Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99 p. 645– 649, 2004.

TARLETON RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses

vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* (1990) 144:717–24

TARTAGLIA, L. A. *et al.* A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell, Cambridge*, v. 74, n. 5, p.845-853, 1993a.

TARTAGLIA, L.A.; PENNICA, D.; GOEDDEL, D.V. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.268, n.25, p.18542-18548, 1993b.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, Oxford, v. 82, n. 974, p. 788–798, 2006.

TRUYENS, C. *et al.* The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 11, 5579-5586, 1999.

TSAI, E. Y. *et al.* Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Molecular And Cellular Biology*, Washington, v. 16, n. 10, p.5232-5244, 1996.

VAIDIAN, Anil K; WEISS, Louis M; TANOWITZ, Herbert B. Chagas disease and AIDS. **Kinetoplastid Biology And Disease**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 2, 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-9292-3-2>

VAN ZEE, K J *et al.* Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 89, n. 11, p.4845-4849, 1992.

VILLAR, Silvina R. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Regulates Glucocorticoid Synthesis in the Adrenal Glands of *Trypanosoma cruzi* Acutely-Infected Mice. The Role of TNF-R1. *Plos One*, San Francisco, v. 8, n. 5, p.1-13, 2013.

VITELLI-AVELAR, D. M.; SATHLER-AVELAR, R.; DIAS, J. C. P.; PASCOAL, V. P. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; LAGE, P. S.; ELOI-SANTOS, S. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.. 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. **Scandinavian Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 62, n. 3, p. 297-308, set. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01668.x>.

WEINBLATT, Michael E.; KEYSTONE, Edward C.; FURST, Daniel E.; MORELAND, Larry W.; WEISMAN, Michael H.; BIRBARA, Charles A.; TEOH, Leah A.; FISCHKOFF, Steven A.; CHARTASH, Elliot K.. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor α monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the armada trial. **Arthritis &**

Rheumatism, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 35-45, jan. 2003. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1002/art.10697>.

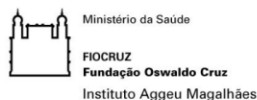
WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 90, n. 6, p. 33–44, 2015.

WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/77950>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

WHO. Chagas Disease (American trypanosomiasis). 2019. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 28 out. 2018.

WILLIAMS, Matthew A.; BEVAN, Michael J.. Effector and Memory CTL Differentiation. **Annual Review Of Immunology**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 171-192, 1 abr. 2007. Annual Reviews.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141548>.

APÊNDICE A



Página 1/2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Portador da doença de Chagas

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa **PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES DE EVOLUÇÃO CLÍNICA E DE TRATAMENTO ETIOLÓGICO NA DOENÇA DE CHAGAS**, sob a responsabilidade da pesquisadora Virginia Lorena do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Essa pesquisa pretende investigar biomarcadores de progressão da Doença de Chagas em portadores da fase crônica e evolução clínica do tratamento.

Sua participação é muito importante, pois, como portador da doença de Chagas, o (a) Sr (a) possui o parasita que causa essa doença. É com seu sangue e de outros portadores da doença que conseguiremos identificar uma ou mais moléculas que o seu corpo produz em resposta ao parasita e dessa forma, compreender os mecanismos da sua imunidade, possibilitando aos médicos, de forma precoce, atenção maior em casos que o Sr (a) adoeça novamente, casos que o tratamento não esteja sendo eficaz e principalmente para saber se o tratamento está sendo eficaz. Sua participação é totalmente voluntária e se dará através de um formulário de pesquisa, onde algumas perguntas sobre seus hábitos de vida e aspectos clínicos serão analisados, que pode lhe causar constrangimento pelo conteúdo abordado. Além disso, iremos coletar até 4 tubos de sangue (10 mL) através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento traz poucos riscos, mas pode causar dor no local da coleta ou mancha vermelha (hematoma), caso aconteçam, poderão ser realizadas compressas frias no local. Esse sangue será utilizado para: obtenção de soro (parte líquida) para confirmação da infecção e os resultados dos seus exames clínicos como raio-X (tórax e esôfago), eletrocardiograma e ecocardiograma, entre outros, serão consultados através do seu prontuário médico e avaliados pelos pesquisadores e seu médico.

A amostra de sangue será armazenada a -20°C para utilizações em pesquisas futuras, com o objetivo de realizar novos estudos que complementem os objetivos propostos nessa nossa pesquisa, que busca a investigação de biomarcadores de progressão clínica da doença de Chagas crônica e avaliação após o tratamento. Desta forma, se no futuro, sua amostra armazenada for utilizada para outra pesquisa, poderemos entrar em contato para preenchimento de outro TCLE. Informações sobre o andamento e resultados das pesquisas podem ser fornecidas para o (a) Sr (a) quando desejar, através das formas de contato conosco, disponibilizadas ao final deste documento.

Rubrica do participante: _____

Rubrica do pesquisador responsável: _____

Garantiremos a confidencialidade das informações prestadas, assim como o anonimato de todos que participarem da pesquisa. Se o (a) Sr (a) aceitar participar, estará contribuindo para a geração de conhecimento sobre o diagnóstico da doença de Chagas. Caso o (a) Sr (a) não aceite participar da pesquisa o seu atendimento no ambulatório continuará acontecendo normalmente. Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. No entanto, caso tenha qualquer necessidade de despesa decorrente da sua participação na pesquisa, haverá ressarcimento pelo grupo de pesquisa. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da sua participação no estudo, será devidamente indenizado judicialmente.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada em hipótese alguma, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato conosco através do endereço: Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Campus da UFPE, Av. Moraes Rego, s/n, pelo telefone (81) 2101-2563 com a pesquisadora Dra Virginia Lorena, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/IAM/FIOCRUZ, telefone (81) 2101-2639.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado (a) sobre o que o pesquisador quer fazer e o porquê precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair do projeto quando quiser.

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

Data: ____/____/____



Assinatura do participante ou Impressão do dedo polegar



Virginia Maria Barros de Lorena
Pesquisadora Responsável - IAM/Fiocruz
Telefone: (81) 2101-2563
E-mail: lorena@cpqam.fiocruz.br

APÊNDICE B



Página 1/2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Não Portador da doença de Chagas

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa **PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES DE EVOLUÇÃO CLÍNICA E DE TRATAMENTO ETIOLÓGICO NA DOENÇA DE CHAGAS**, sob a responsabilidade da pesquisadora Virginia Lorena do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Essa pesquisa pretende investigar biomarcadores de progressão da Doença de Chagas em portadores da fase crônica e evolução clínica do tratamento.

Sua participação é muito importante, pois, como não portador da doença de Chagas, o (a) Sr (a) não possui o parasita que causa essa doença. É com seu sangue e de outros não portadores da doença, que conseguiremos identificar uma ou mais moléculas que o seu corpo produz e dessa forma, compreender os mecanismos da sua imunidade. Sua participação é totalmente voluntária e se dará através de um formulário de pesquisa, onde algumas perguntas sobre seus hábitos de vida e aspectos clínicos serão analisados, que pode lhe causar constrangimento pelo conteúdo abordado. Além disso, iremos coletar até 4 tubos de sangue (10 mL) através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento traz poucos riscos, mas pode causar dor no local da coleta ou mancha vermelha (hematoma), caso aconteçam, poderão ser realizadas compressas frias no local. Esse sangue será utilizado para obtenção de soro (parte líquida) para confirmação da não infecção.

A amostra de sangue será armazenada a -20°C para utilizações em pesquisas futuras, com o objetivo de realizar novos estudos que complementem os objetivos propostos nessa nossa pesquisa, que busca a investigação de biomarcadores de progressão clínica da doença de Chagas crônica e avaliação após o tratamento. Desta forma, se no futuro, sua amostra armazenada for utilizada para outra pesquisa, poderemos entrar em contato para preenchimento de outro TCLE. Informações sobre o andamento e resultados das pesquisas podem ser fornecidas para o (a) Sr (a) quando desejar, através das formas de contato conosco, disponibilizadas ao final deste documento.

Garantiremos a confidencialidade das informações prestadas, assim como o anonimato de todos que participarem da pesquisa. Se o (a) Sr (a) aceitar participar, estará contribuindo para a geração de conhecimento sobre o diagnóstico da doença de Chagas. Caso o (a) Sr (a) não aceite participar da pesquisa o seu atendimento no ambulatório continuará acontecendo normalmente.

Rubrica do participante: _____

Rubrica do pesquisador responsável: _____

Se depois de consentir em sua participação o (a) Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. No entanto, caso tenha qualquer necessidade de despesa decorrente da sua participação na pesquisa, haverá ressarcimento pelo grupo de pesquisa. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da sua participação no estudo, será devidamente indenizado judicialmente.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato através do endereço Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Campus da UFPE, Av. Moraes Rego, s/n, pelo telefone (81) 2101-2563 com a pesquisadora Dra Virginia Lorena, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/IAM/FIOCRUZ, telefone (81) 2101-2639.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado (a) sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair do projeto quando quiser.

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

Data: ____/____/____



Assinatura do participante ou Impressão do dedo polegar

Virginia Maria Barros de Lorena
Pesquisadora Responsável - IAM/Fiocruz
Telefone: (81) 2101-2563
E-mail: lorena@cpqam.fiocruz.br

APÊNDICE C

Immunobiology 227 (2022) 152166



Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/imbio

Is a negative correlation between sTNFR1 and TNF in patients with chronic Chagas disease the key to clinical progression?

Diego José Lira Torres^a, Tiago Ribeiro De Arruda^a, Michelle da Silva Barros^a, Juliana Prado Gonçalves^b, Ana Karine Araújo Soares^c, Kamila Kássia dos Santos Oliveira^a, Leyllane Rafael Moreira^a, Carolina Medeiros^d, Maria da Glória Aureliano Melo Cavalcanti^d, Sílvia Marinho Martins^d, Cristina Carrazzone^d, Wilson Oliveira^d, Joseli Lannes-Vieira^e, Virginia Maria Barros de Lorena^{a,*}

^a Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Instituto Aggeu Magalhães, Laboratório de Imunoparasitologia, Recife, PE, Brazil

^b Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Laboratório de Virologia, Recife, PE, Brazil

^c Fundação Altino Ventura - FAV, Recife, PE, Brazil

^d Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^e Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia das Interações, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Chagas disease
Chagas cardiomyopathy
TNF- α
TNFR1
TNFR2

ABSTRACT

Soluble TNF receptors (sTNFR1 and sTNFR2) are natural endogenous inhibitors of TNF and are elevated in inflammatory, autoimmune, and chronic degenerative diseases. In Chagas disease, pleiotropic cytokine TNF is considered key in immunopathology. Thus, we aimed to evaluate the levels of TNF, sTNFR1, and sTNFR2 in the serum of patients with chronic Chagas disease. TNF and its soluble receptors were quantified using Cytometric Bead Array in the serum of 132 patients, of which 51 had the indeterminate form (IND), 39 the mild cardiac form (CARD 1), 42 the severe cardiac form (CARD 2), and 20 non-infected individuals (NI). The results indicate that the soluble receptors may regulate TNF in Chagas disease, as their levels were higher in *T. cruzi*-infected individuals when compared to non-infected individuals. We found a moderate negative correlation between sTNFR1 and TNF in individuals with the IND form, suggesting a relationship with non-progression to more severe forms, such as heart disease. sTNFR1 and sTNFR2 were increased in all clinical forms, but with a moderate positive correlation in more severe patients ($r = 0.50$ and $p = 0.0005$). TNF levels showed no statistical differences in the groups of patients. These findings suggest the importance of the endogenous balance of the levels of soluble TNF receptors in the protection and balance in patients with chronic Chagas disease, besides revealing the immunological complexity in chronic *T. cruzi*-infected individuals.

1. Background

Chagas disease (CD), caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects more than 8 million people worldwide and approximately 70 million people are at risk of infection (WHO, 2015). CD is distributed in more than 21 countries in Latin America, causing more than 10,000 deaths annually, and is a serious public health problem in Brazil due to the current outbreaks of oral infection, requiring urgent health measures (Pérez-Molina and Molina, 2018).

Individuals with the indeterminate chronic clinical form present reactive serological tests but have normal imaging exams and no clinical

symptoms (Echavarría et al., 2020). This clinical manifestation is responsible for most cases, being a condition in which the infected person presents a good prognosis and has the same life expectancy as a person without CD (Echavarría et al., 2020). However, asymptomatic individuals may evolve to symptomatic forms after 10 to 30 years of infection. The cardiac form, or chronic chagasic cardiopathy (CCC), is the most severe chronic symptomatic manifestation, affecting about 30% of infected individuals (Lidani et al., 2019). In the heart tissue of the chronic carrier of CD, the inflammatory infiltrate is disproportionate to the amount of parasite that persists in the heart and other tissues. This excessive infiltrate associated with the cellular immune response leads

* Corresponding author.

E-mail address: virginia.lorena@fiocruz.br (V.M.B. Lorena).

<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152166>

Received 7 May 2021; Received in revised form 12 December 2021; Accepted 12 December 2021

Available online 17 December 2021

0171-2985/© 2021 Published by Elsevier GmbH.

to extensive and irreparable tissue damage (Dutra et al., 2009; Gutierrez et al., 2009). It is unclear what specific mechanisms are involved in the clinical evolution of the carrier from the indeterminate to the symptomatic form, but it is believed that the immune response to the protozoan plays an important role (Perez et al., 2011; De Bona et al., 2018; Pérez-Mazliah et al., 2021).

The cytokines produced by activated lymphocytes regulate the immune response and are implicated in the resistance to infection and the clinical evolution of *T. cruzi*-infected individuals (Acevedo et al., 2018). Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC's) especially monocytes/macrophages, and the plasma of patients with IND produce significantly higher amounts of IL-10 compared to individuals with heart disease, suggesting a control of morbidity, especially in late stages when their levels are higher (Lorena et al., 2010; Souza et al., 2014). In contrast, pro-inflammatory cytokines, such as gamma interferon (IFN- γ), TNF, and IL-17, are at higher levels in TCD4, TCD8, and monocyte cells, in addition to serum and plasma from patients with heart disease and possibly represent worsening of cardiac function (Souza et al., 2014; Alvarado-Arnez et al., 2018; Almeida et al., 2018; Curvo et al., 2018).

TNF was described in 1973 as an endotoxin that caused necrosis in tumors *in vitro* (Carswell et al., 1975). Highly inflammatory and considered the most pleiotropic cytokine, TNF performs functions in several cell types and is associated with several infectious, autoimmune, neoplastic, and inflammatory pathologies (Sedger and McDermott, 2014; Jang et al., 2021). TNF is expressed initially as a transmembrane protein (mTNF) in several immune cells, such as monocytes/macrophages, NK cells, and T lymphocytes, in addition to endothelial cells, fibroblasts, and cardiomyocytes (Issuree et al., 2013). By the action of the TNF-converting enzyme (TACE), mTNF is converted into soluble TNF (sTNF), which is the circulating form with an endocrine capacity to act in distant locations (Sedger and McDermott, 2014). The sTNF and mTNF bind to transmembrane receptors, TNFR1 or CD120a and TNFR2 or CD120b, with mTNF a more powerful binder for TNFR2, and sTNF for TNFR1. TNFR1 is found constitutively in most cells, while TNFR2 has a much more restricted expression in immune cells (Holbrook et al., 2019). These receptors can also be cleaved and become soluble type 1 and 2 receptors (sTNFR 1/2) which are considered potent natural TNF inhibitors since they can compete for the binding site of TNF (Ahmad et al., 2018).

It has been demonstrated *in vivo* that the TNF/TNFR1 route plays an important role in *T. cruzi* infection since TNFR1-knockout mice do not survive infection due to high parasitemia, immune imbalance, and cachexia (Kroll-Palhares et al., 2008; Villar et al., 2013). In addition, soluble receptors limit the deleterious activity of TNF (Truys et al., 1999). In humans, TNF seems to be an important inflammatory mediator in immunopathological mechanisms during the chronic phase of Chagas disease. Therefore, evaluating soluble receptors, which are inhibitors of this cytokine, may improve the understanding of the chronic clinical evolution of the infection as well as the search for new immunological biomarkers.

2. Materials and methods

Population and study site - This study was conducted in accordance with the recommendations of the FIOCRUZ/PE committee (CAAE: 0022.0.095.000-07 and 0032.095.000-10). All subjects signed written informed consent forms in accordance with the the guidelines of CNS Resolution 466/2012 of the National Health Council/Ministry of Health of Brazil. One-hundred and thirty-two patients chronic with Chagas disease were selected at the Outpatient Clinic for Chagas Disease and Cardiac Insufficiency of the Cardiac Emergency Department of Pernambuco (PROCAPE)/University of Pernambuco (UPE). Individuals who had received previous treatment with Benznidazole and/or who presented with digestive complaints were excluded from the study. The clinical classification was performed by cardiologists following the II Brazilian Consensus on Chagas disease (Dias et al., 2016). Individuals

were included in the study after serological confirmation and imaging examinations, such as: Echocardiogram (ECHO), Electrocardiogram (EKG), Chest and Esophagus X-Rays. Thus, the patients were classified as *T. cruzi*-infected individuals in the indeterminate form (IND) (n = 51, age range: 30–75 years old), with reactive serology and conventional EKG, normal chest, esophagus, and colon radiological study; *T. cruzi*-infected individuals of the mild heart form (CARD 1) (n = 39, age range: 41–88 years old) with altered EKG and ECHO, ventricular function $\geq 45\%$ and absence of heart failure; *T. cruzi*-infected individuals of the severe heart form (CARD 2) (n = 42, age range: 24–76 years old) with altered EKG and ECHO but already with compensated heart failure (Table 1). Additionally, 20 non-infected individuals (NI, age: Min-Max: 18–38 years) were included in the study as negative controls, who did not live in an area endemic to Chagas disease, had never received blood transfusion; and presented a “non-reactive” serological test for Chagas disease.

Blood collection and serology - Ten milliliters of blood were collected in tubes without anticoagulants to obtain serum. The samples were aliquoted and stored at -20°C in the serum bank of the Reference Service in Chagas Disease (RSCD) of the Instituto Aggeu Magalhães (IAM). The confirmation of the infection was performed through the use of two immune-enzymatic tests: conventional ELISA, using a commercial Chagas III ELISA test kit (Biochile, Grupo Bio, Santiago, Chile); and recombinant ELISA, using a commercial Wama Imuno-ELISA kit (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brazil) according to the manufacturers' guidelines.

Quantification of soluble TNF receptors (sTNFR1 and sTNFR2) and TNF in serum samples by Cytometric Bead Array (CBA) - The levels of sTNFR1, sTNFR2 and TNF were quantified in the serum samples of individuals through the Human Flex TNF, sTNFR1 and sTNFR2 Cytometric Bead Array (CBA) system (Catalog No. 558273, 560,156 and 560155; Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The beads were acquired within 24 h using the FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed through the FACSArray version 3.01 software (Becton Dickinson). The threshold standard curve detection for TNF, sTNFR1 and sTNFR2 were 3.08, 1.81, and 2.27 pg/mL, respectively.

Statistical Analysis - Variables were presented as descriptive measures: mean, median and standard deviation. The distribution of the data was evaluated by the D'Agostino-Pearson test, where it was verified that the data were non-parametric. Later, the Kruskal-Wallis test was used to evaluate the difference between the groups. Once the association was verified, the Mann-Whitney test was used for quantitative comparisons of receptors and cytokine between groups. The evaluation of correlations between TNFR1/2 versus TNF, TNFR1 versus TNFR2 and TNFR1/

Table 1
Epidemiological and clinical characterization of patients.

	NI	IND	CARD 1	CARD 2
Number of patients	20	51	39	42
Region *				
Agreste	–	9 (17.6%)	10 (25.6%)	13 (31%)
Mata	–	7 (13.7%)	12 (30.8%)	13 (31%)
Metropolitan	19 (95%)	7 (13.7%)	5 (12.8%)	4 (9.40%)
Sertão	–	20 (39.2%)	9 (23.1%)	6 (14.3%)
Other states	1 (5%)	8 (15.7%)	3 (7.69%)	6 (14.3%)
Echocardiogram LVEF (%)	–	66.9 $\pm$ 5.0	63.2 $\pm$ 7.4	39 $\pm$ 12.9 ^{***}

NI: not infected; IND: indeterminate form; CARD 1: mild cardiac form; CARD 2: severe cardiac form. LVEF: Left ventricular ejection fraction. ^a results presented as frequency.

^{*}, $P < 0.0001$, CARD 2 vs IND; ^{***} $P < 0.0001$, CARD2 vs CARD1 (Mann-Whitney test).

2, and TNF versus left ventricular ejection fraction (LVEF) was performed using the Spearman correlation test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) and data were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

Chagas disease patients have increased soluble TNF receptors levels - We found that sTNFR1 and sTNFR2 are elevated in chronic carriers of Chagas disease when compared to non-infected individuals (NI) (Fig. 1b and 1c) ($p < 0.0001$). We analyzed the serological concentration of these receptors in the presence of heart disease by comparing the IND group with the CARD groups (CARD1 and 2), but differences between the clinic forms were not statistically significant.

sTNFR1 and sTNFR2 levels were increased in all clinical forms, but sTNFR1 correlates negatively with TNF in serum of patients with indeterminate form. We correlated the levels of TNF with its receptors in the IND and CARD clinical forms (Table 2). We found a low negative correlation ($r = -0.38$; $p = 0.0058$) between sTNFR1 and TNF, suggesting that as sTNFR1 increases, TNF levels decrease in IND group. There was no significant correlation between sTNFR2 and TNF in chronic individuals and neither between sTNFR1 and TNF in CARD 1 and CARD 2. When correlating sTNFR1 versus sTNFR2, we found a positive correlation in chronic *T. cruzi*-infected individuals, but the group with severe heart disease (CARD 2) presented a higher rank (R) when compared to IND and CARD 1, making for a moderate correlation ($r: 0.50$) (Fig. 2). To evaluate the relationship of sTNFR1 and sTNFR2 with the degree of cardiac dysfunction (sTNFR vs %LVEF) we made a correlation with data on the percentage of left ventricular ejection fraction (%LVEF). However, no statistically significant correlation was found.

Concentration of TNF below the detection limit - We analyzed the serum levels of TNF, which not only did not present any statistical difference among the groups but also their levels remained below the detection limit (3.08 pg/mL). Although there was no statistically significant difference among the groups evaluated (Fig. 1a), the IND form had lower TNF levels (Median: 0.39 pg/mL) when compared to non-infected individuals and cardiac forms (Median: 0.48 and 0.45 pg/mL, respectively) (Fig. 1a).

4. Discussion

Previous studies demonstrated that the TNF/TNFR1 route has an important role in controlling parasitemia, induction of inflammation, cachexia, and survival of *T. cruzi*-infected animals (Truyens et al. 1999; Kroll-Palhares et al., 2008). Further, it is known that soluble TNF receptors (sTNFR1 and sTNFR2) neutralize cytokine and are potent natural endogenous inhibitors of TNF (Van Zee et al., 1992). Herein, we aimed to dose sTNFR1 and sTNFR2 receptors in chronic Chagas disease individuals of Chagas disease to understand their role in the molecular mechanisms of TNF and determine if these molecules could be relevant immunological biomarkers of Chagas disease severity and/or prognosis.

The results showed that individuals with chronic Chagas disease have higher levels of soluble TNF than non-infected individuals (Fig. 1b and 1c). Since Chagas disease is a chronic inflammatory pathology, this finding is expected and corroborates with in studies of other chronic autoimmune inflammatory diseases (Arias et al., 2014; Kim et al., 2016) and parasitic infection (Bessa et al., 2012; Rostami et al., 2016).

Our findings corroborate *ex-vivo* studies that reported sTNFR2 levels much higher in plasma and serum from infected humans (García et al., 2008). González et al. (2018) found that TNFR2 levels were higher in peripheral blood cells of patients with the indeterminate or cardiac form of Chagas disease compared to non-infected individuals. (Fig. 1c) On the other hand, the authors found no statistically significant difference in the plasma levels of TNF nor TNFR1 among the patients with different clinical forms of chronic Chagas disease, nor between the Chagas disease group and control group.

Mocelin et al. (2005) did not find any statistically significant difference in the plasma levels of sTNFR1 between *T. cruzi*-infected and non-infected individuals. However, the small number of patients and the technique used by the authors may have biased the study. To evaluate the soluble receptors and TNF, we used a CBA kit that presents some advantages over Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

TNFR1 is important in recruiting neutrophils and macrophages, but not lymphocytes to the inoculum site, since mice deficient in TNFR1 did not present these cells from the innate immune response at the inoculum sites (Aliberti et al., 2001). In cardiac tissues from TNFR1^{-/-} deficient mice showed a decrease in TCD4 and TCD8 lymphocytes, demonstrating the role of the receptor in inducing myocarditis, especially composed of lymphocytes during acute infection (Kroll-Palhares et al., 2008). Although we did not study the expression of transmembrane receptors (mTNFR) and there was no statistically significant difference among the clinical forms of Chagas disease (IND, CARD1 and CARD2), the mean levels of sTNFR1 tend to increase in these groups of patients (Fig. 1a).

We observed a moderate correlation between sTNFR1 and sTNFR2 levels in the chronic clinical forms of Chagas disease (Fig. 2). However, the correlation between sTNFR2 and sTNFR1 was slightly higher in the more severe cardiac form than in the mild cardiac form (Fig. 2c), which could lead to regulatory effects on TNF activity and thus attenuate its deleterious actions on the cardiac tissue. This idea can also be supported by the correlations made between sTNFR and left ventricular ejection fraction (sTNFR1 versus % LVEF; sTNFR2 versus % LVEF), which is considered the most important parameter in the assessment of ventricular systolic function and the best prognostic indicator of survival in cardiac patients. In other words, receptors do not correlate with cardiac damage, but can act as regulators, as they increase in the most severe cardiac form.

In analyzes of other heart functions, Silva et al. (2020) found that high plasma levels of sTNFR are associated with systolic dysfunction and cardiac dilation in patients with Chagas heart disease.

TNF plays a beneficial role during the acute phase in infected animals, but it also triggers harmful effects such as cachexia and death. In general, these effects are limited by the endogenous action of its soluble receptors and determine the outcome of the infection. sTNFR2 has been found to be more associated with a neutralizing activity of the cytokine TNF in mice plasma. Low sTNFR/TNF ratios were associated with mortality and cachexia in untreated infected animals and those treated with anti-TNF TN3 antibody (Truyens et al., 1999).

We analyzed the correlation between sTNFR1 and TNF in individuals with the chronic forms of the disease and found a moderate negative correlation: while sTNFR1 levels increase, TNF levels decrease (Table II). It is well established that the indeterminate form represents a balance between host and parasite. Given this, our findings support the hypothesis that the sTNFR1 receptor regulates TNF activity in individuals with the indeterminate form by attenuating the damaging effects of TNF on organs target by the disease and, consequently, delaying the progression of the disease to a more severe form. (Dutra et al., 2014).

Studies using plasma or cell culture supernatant collected from humans have shown that TNF levels increase in patients with CCC compared to patients with the IND form and that this increase is directly related to cardiac damage (Alvarado-Amez et al., 2018). We did not find higher levels of TNF in the CARD 1 and CARD 2 groups (Fig. 1a).

As the serum concentration of TNF in our study were below the threshold stipulated by the kit, we plotted samples never frozen or frozen only once to rule out the hypothesis of cytokin degradation during the experiment. We also ruled out the possibility of any defect on the CBA Flex TNF kit because the curve was linear ($R^2 = 98.96\%$). Therefore, we believe that the consumption of TNF occurred in the inflamed sites of the organism, especially in patients with chagasic heart disease. Furthermore, the effects of dilution in blood and a targeted release of TNF in organs, especially the heart, may not be reflected in circulatory levels (García et al., 2008).

Recent studies have shown that plasma levels of TNF do not present

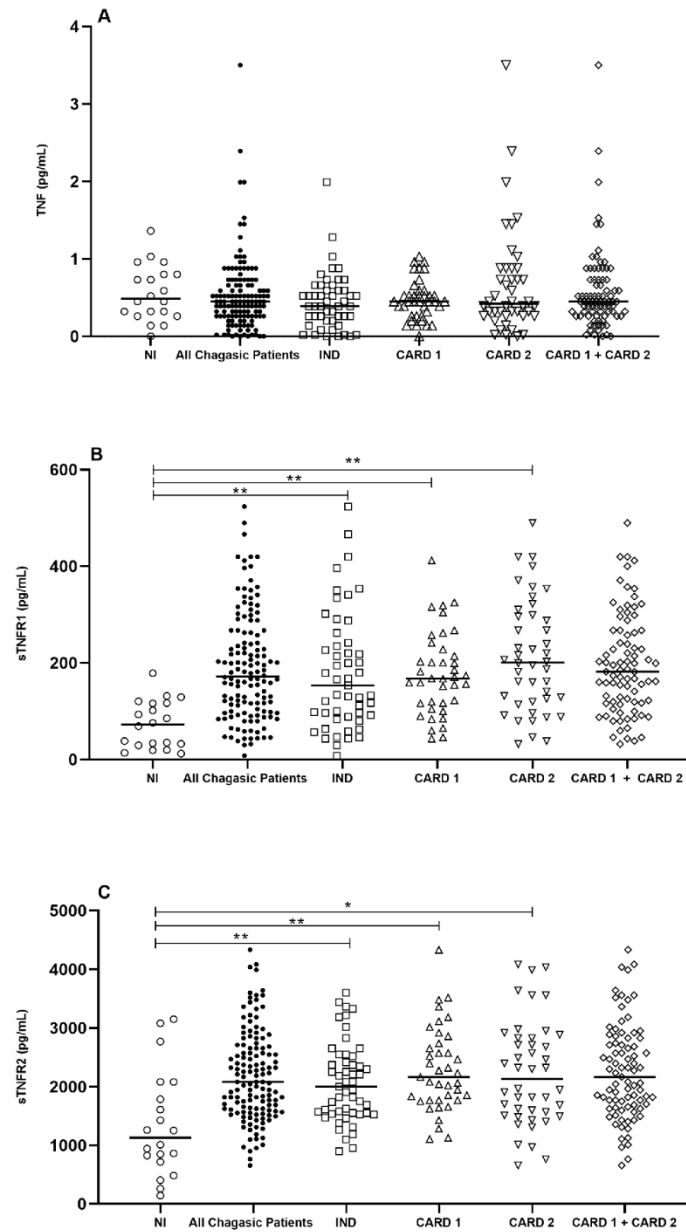


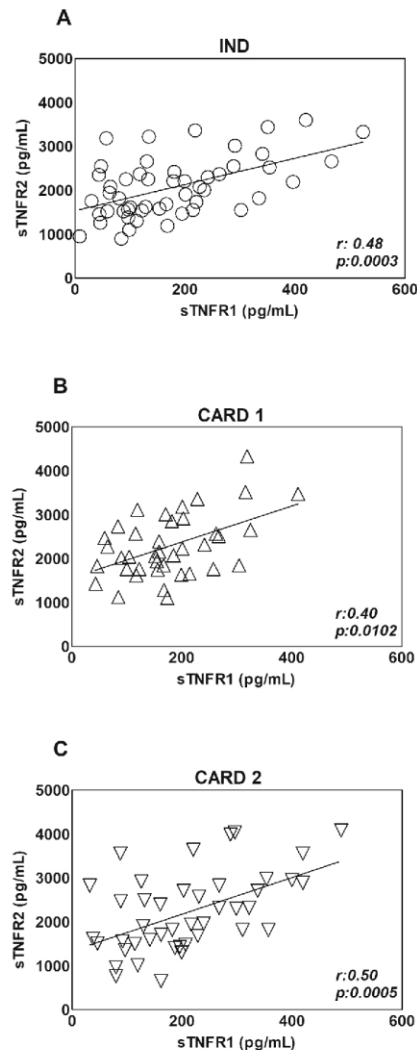
Fig. 1. A) TNF levels not change in patients with Chagas disease and remain below the detection limit. B) e C): Soluble TNF receptors increase in serum of patients of Chagas disease. Legend: Groups NI (n = 20), IND (n = 39), CARD 1 (n = 39) and CARD 2 (n = 42). The lines represent the median of each group and the statistical differences are indicated by the bars represented by *: P < 0.05 and **: P < 0.0001. NI vs All chagasic patients: p < 0.0001.

Table 2

Correlation between serological concentration of sTNFR1 and sTNFR2 vs TNF in carriers of chronic Chagas disease.

	IND		CARD 1		CARD 2		ALL	
	r	p	r	p	r	p	r	p
sTNFR1 vs TNF	-0.38	0.0058	-0.16	0.3256	-0.05	0.7426	-0.19	0.0240
sTNFR2 vs TNF	-0.24	0.0820	0.22	0.5251	-0.20	0.1942	-0.11	0.1873

Legend: r: Spearman rank; p: p value.

**Fig. 2.** Both receptors increase in the serum of patients with Chagas disease with a strong correlation in the most severe clinical form. Legend: IND: indeterminate form; CARD 1: mild heart form; CARD 2: severe heart form.

significant changes in chronic *T. cruzi*-infected individuals (Gonzalez et al., 2018), with a difference only in the group without the disease and that the levels of this cytokine in *T. cruzi*-infected individuals are below the detection limit for TNF (3 pg / mL), the same detection limit found in our results (Gómez-Olarte et al., 2019). Other studies have measured the levels of IFN- γ and TNF in serum of patients with different clinical forms of Chagas disease. Serum levels of TNF and IFN- γ did not differ among clinical forms nor severity degree of the disease (Vasconcelos et al., 2015). Our results corroborated these findings and showed that those with the IND form have the lowest levels of TNF.

Individuals with the IND form present a less inflammatory profile but with persistence of the parasite (Curvo et al., 2018). We also believe that this decrease in TNF is related to the lack of activation of a Th1 profile or that other cell profiles, such as Th17, contribute more to the intracellular elimination of *T. cruzi*. Therefore other cytokines should be evaluated, such as IL-10 and IL-17 (Cai et al., 2016). In *in vitro* models, IL-10 acts inhibiting the pro-inflammatory activity of TNF indirectly by increasing soluble receptors and decreasing transmembrane receptors or by directly inhibiting TNF release (Joyce et al., 1994).

5. Conclusion

All findings suggest the importance of the endogenous balance of soluble TNF receptors, which may indicate protection to patients with chronic Chagas disease. In addition, the TNF/TNFR1 route seems to be paramount in the course of the disease in humans. Our results on TNF cytokine corroborate other recent studies and highlight the complexity of the immune response against *T. cruzi* in chronic CD. As perspectives, we aim to address the mechanisms of TNFR activity in the peripheral blood cell from Chagas disease patients. Studies on cytokine profiles and frequency of receptors involved in apoptosis would also contribute to a better understanding of the immunopathology of chronic Chagas disease.

CRediT authorship contribution statement

Diego José Lira Torres: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Visualization. **Tiago Ribeiro de Arruda:** Methodology, Validation. **Michelle da Silva Barros:** Formal analysis, Data curation, Investigation. **Juliana Prado Gonçalves:** Formal analysis, Data curation, Investigation. **Ana Karine Araújo Soares:** Validation. **Kamila Kássia dos Santos Oliveira:** Methodology, Validation. **Leyllane Rafael Moreira:** Methodology, Validation. **Carolina Medeiros:** Methodology. **Maria da Gloria Aureliano Melo Cavalcanti:** Methodology. **Sílvia Marinho Martins:** Methodology. **Cristina Carrazzone:** Supervision. **Wilson Oliveira:** . **Joseli Lannes-Vieira:** Conceptualization, Formal analysis, Writing – review & editing. **Virginia Maria Barros de Lorena:** Conceptualization, Methodology, Resources, Data curation, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors are grateful to all the patients who volunteered in the study; to the Outpatient Clinic of Chagas Disease and Heart Failure of the Emergency Department of Pernambuco (PROCAPE); and to the Instituto Aggeu Magalhães for all the technical and scientific support. In addition, the authors are grateful for the financial support of the following institutions: the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES); the National Council for Technological Development (CNPq) (Universal/CNPq 474926/2012-5); and the Program of Excellence in Research of the Foundation for the Support of Science and Technology of Pernambuco (Proep-Facepe APQ-1703-2.11/15).

References

- Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relev Epidemiol Hebd.* 2015;90: 33–43. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671846>.
- Pérez-Molina, J.A., Molina, L., 2018. Chagas disease. *Lancet* 391 (10115), 82–94.
- Echavarría, N.G., Echeverría, L.E., Stewart, M., Gallego, C., Saldarraga, C., 2020. Chagas disease: chronic Chagas cardiomyopathy. *Curr. Probl. Cardiol.* 1, 100507.
- Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., Sandri, T.L., 2019. Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. *Front. Public Health* 7, 166. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>. PMID: 31312626; PMCID: PMC6614205.
- Dutra, W.O., Menezes, C.A.S., Villani, F.N.A., et al., 2009. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (1), 208–218.
- Gutierrez, F.R.S., Guedes, P.M.M., Gazzinelli, R.T., Silva, J.S., 2009. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31 (11), 673–685.
- Pérez, A.R., Silva-Barbosa, S.D., Roggero, E., Calmon-Hamaty, F., Villar, S.R., Gutierrez, F.R., et al., 2011. Immunomodulation of the thymus in Chagas disease. *NeuroImmunoModulation* 18 (5), 328–338.
- De Bona, E., Lidani, K.C.F., Bavia, L., Omidian, Z., Gremski, L.H., Sandri, T.L., Messias-Reason, I.J., 2018. Autoimmunity in chronic Chagas disease: a road of multiple pathways to cardiomyopathy. *Front. Immunol.* 9, 1842.
- Pérez-Maziah, D., Ward, A.L., Lewis, M.D., 2021. Host-parasite dynamics in Chagas disease from systemic to hyper-local scales. *Parasite Immunol.* 43, e12786 <https://doi.org/10.1111/pim.12786>.
- Acevedo, G.R., Girard, M.C., Gómez, K.A., 2018. The unsolved jigsaw puzzle of the immune response in Chagas disease. *Front. Immunol.* 9, 1929.
- Lorena, V.M., Lorena, I.M., Braz, S.C., Melo, A.S., Melo, M.F., Melo, M.G., et al., 2010. Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand. J. Immunol.* 72 (6), 529–539.
- Souza, G.R., Gomes, J.A.S., Fares, R.C.G., et al., 2014. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. *PLoS ONE* 9, 1–9.
- Alvarado-Arnez, L.E., Batista, A.M., Alves, S.M., Melo, G., Lorena, V.M.B., Cardoso, C.C., et al., 2018. Single nucleotide polymorphisms of cytokine-related genes and association with clinical outcome in a Chagas disease case-control study from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113 (6), e170489.
- Almeida, M.S., Lorena, V.M.B., Medeiros, C.A., et al., 2018. Alternative Th17 and CD4+ CD25+ FoxP3+ cell frequencies increase and correlate with worse cardiac function in Chagas cardiomyopathy. *Scand. J. Immunol.* 87, 1–11.
- Curvo, E.O.V., Ferreira, R.R., Madeira, F.S., et al., 2018. Correlation of transforming growth factor- β and tumour necrosis factor levels with left ventricular function in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113, 1–8.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 3666–3670.
- Sedger, L.M., McDermott, M.F., 2014. TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 453–472.
- Jang, D.-I., Lee, A.-H., Shin, H.-Y., Song, H.-R., Park, J.-H., Kang, T.-B., Lee, S.-R., Yang, S.-H., 2021. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>.
- Issuree, P.D., Maretzky, T., McIlwain, D.R., et al., 2013. IRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* 25, 1–5.
- Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H., McDermott, M.F., et al., 2019. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res* 8, 1–12.
- Ahmad, S., Aziz, N.A., Boer, J.C., Lim, J., Chen, X., Plebanski, M., et al., 2018. The key role of TNF-TNFR2 interactions in the modulation of allergic inflammation: a review. *Front. Immunol.* 9 (2572), 1–10.
- Kroll-palhares, K., Silvério, J.C., Da Silva, A.A., et al., 2008. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF- α blockade. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 375–385.
- Villar, S.R., Ronco, M.T., Bussy, R.F., et al., 2013. Tumor necrosis factor- α regulates glucocorticoid synthesis in the adrenal glands of *Trypanosoma cruzi* acutely-infected mice. The role of TNF-R1. *PLoS ONE* 8, 1–13.
- Truysen, C., Torrico, F., Lucas, R., De Baetselier, P., Buurman, W.A., Carlier, Y., 1999. The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 67, 5579–6558.
- Van Zee, K.J., Kohno, T., Fischer, E., Rock, C.S., Moldawer, L.L., Lowry, S.F., 1992. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *PNAS* 89, 4845–4849.
- Arias, J., Valero, N., Mosquera, J., et al., 2014. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology* 452–453, 42–51.
- Kim, H.L., Lee, J.P., An, J.N., et al., 2016. Soluble tumor necrosis factor receptors and arterial stiffness in patients with coronary atherosclerosis. *Am. J. Hypertens.* 1–6.
- Bessa, T.F., Cordeiro, C.A., Gonçalves, R.M., et al., 2012. Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor-2 (sTNFR2) in patients with active toxoplasmic retinochoroiditis. *Braz. J. Infect. Dis.* 16, 540–544.
- Rostami, M.N., Jashi, E.S., Khamesipour, A., Mohammadi, A.M., 2016. Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α) and its soluble receptor type 1 (sTNFR 1) in human active and healed leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 38, 255–260.
- Silva, H.T., Costa, H.S., Lima, V.P., et al., 2020. Plasma levels of soluble TNF receptors are associated with cardiac function in patients with Chagas heart disease. *Int. J. Cardiol.* 316, 101–103.
- García, M.M., Derissio, A.M., Villalonga, X., Mengoni, E., Cardon, L.R., 2008. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors (sTNF-R1 and -R2) in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and their children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 499–503.
- González, F., Villar, S., D'Attilio, et al., 2018. Dysregulated network of immune, endocrine and metabolic markers is associated to more severe human chronic chagas cardiomyopathy. *NeuroImmunoModulation* 25, 119–128.
- Mocelin, A.O., Issa, V.S., Bacal, F., Guimarães, G.V., Cunha, E., Bochi, E.A., 2005. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* 7, 869–873.
- Aliberti, J.C.S., Souto, J.T., Marino, A.P.M.P., et al., 2001. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Pathol.* 158, 1433–1440.
- Dutra, W.O., Menezes, C.A.S., Magalhães, L.M.D., 2014. GOLLOB KJ immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 36, 377–387.
- Gómez-Olarte, S., Bolaños, N.L., Echeverry, M., Rodríguez, A.N., Cuéllar, A., Puerta, C.J., et al., 2019. Intermediate monocytes and cytokine production associated with severe forms of Chagas disease. *Front. Immunol.* 10, 1671.
- Vasconcelos, R.H.T., Azevedo, E.A.N., Diniz, G.T.N., Cavalcanti, M.G.A.M., Oliveira, W., Moraes, C.N.L., et al., 2015. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha serum levels in chronic Chagas disease patients. *Parasite Immunol.* 37 (7), 376–379.
- Cai, C.W., Blase, J.R., Zhang, X., Eickhoff, C.S., Hoft, D.F., et al., 2016. Th17 Cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 12 (10), e1005902.
- Joyce, D.A., Gibbons, D.P., Green, P., Steer, J.H., Feldmann, M., Brennan, F.M., 1994. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur. J. Immunol.* 24, 2699–2705.

ANEXO A



DECLARAÇÃO

O CEP-IAM/Fiocruz, declara para os devidos fins, que o projeto abaixo discriminado, atende às exigências legais e demais solicitações demandadas por este Comitê de Ética, para que possa dar início a pesquisa, a partir de 05 de fevereiro de 2020.

Título da Pesquisa: Prospecção de biomarcadores de evolução clínica e de tratamento etiológico na doença de Chagas

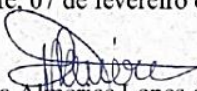
Pesquisador Responsável: Virginia Maria Barros de Lorena

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

CAAE: 20049919.5.0000.5190

Número do Parecer: 3.822.710

Recife, 07 de fevereiro de 2020


Maria Almerice Lopes da Silva
Coordenação CEP/IAM

Maria Almerice Lopes da Silva
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Mat. Signo 1362520
IAM/FIOCRUZ