

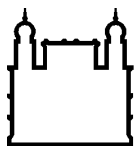
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado - Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular

**INTERAÇÕES IMUNOENDÓCRINAS NA MIGRAÇÃO DE
LINFÓCITOS NA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA CRÔNICA:
RELAÇÃO COM A CARDIOPATIA.**

LUIZ RICARDO BERBERT

Rio de Janeiro, Abril de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

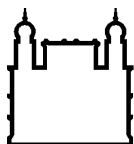
LUIZ RICARDO BERBERT

Interações imunoendócrinas na migração de linfócitos na doença de chagas humana crônica: relação com a cardiopatia.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Wilson Savino

RIO DE JANEIRO, Abril de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: LUIZ RICARDO BERBERT

INTERAÇÕES IMUNOENDÓCRINAS NA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS NA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA CRÔNICA: RELAÇÃO COM A CARDIOPATIA.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wilson Savino

Aprovada em: 30/04/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr. José Rodrigues Coura- Presidente(IOC-FIOCRUZ)

Prof. Dr. Vinícius Frias de Carvalho (IOC-FIOCRUZ)

Prof. Dr. Alexandre Morrot (IMPG-UFRJ)

Prof^a Dra. Juliana de Meis(IOC-FIOCRUZ)

Prof^a Dra. Fernanda Pinto Mariz(IPPMMG-UFRJ)

Rio de Janeiro, 30 de abril de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B484 Berbert, Luiz Ricardo

Interações imunoendócrinas na migração de linfócitos na doença de chagas humana crônica: relação com a cardiopatia / Luiz Ricardo Berbert. – Rio de Janeiro, 2015.

xv,71 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 45-64

1. Doença de Chagas. 2. Neuroimunomodulação. 3. Migração linfocitária. I. Título.

CDD 616.9363

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Wilson Savino, pelo conjunto da obra, que desde minha entrada no laboratório me forneceu a base e o aprendizado para conseguir realizar este projeto, além de sua imensa capacidade científica e de liderança. Agradeço por todas as oportunidades, sugestões e críticas, e espero continuar tendo esse apoio durante minha vida profissional.

Ao grupo colaborador argentino, principalmente Ana Rosa Pérez, por todo suporte, aprendizado e amizade durante este trabalho e colaborações anteriores, e cuja presença, esforço e talento fizeram o trabalho crescer. A Oscar Bottasso e Juan Beloscar, por abrirem as portas de seus laboratórios e consultórios e me dar todo suporte no trato com os pacientes. À Florência Gonzalez, Romina Manarín e Silvina Villar, obrigado também pelo suporte, aprendizado e amizade durante todo esse tempo, agradeço muito a acolhida. A todos os outros colaboradores do Instituto de Imunologia e de Cardiologia da Universidade Nacional de Rosário, muito obrigado! Aos pacientes argentinos que cederam de boa vontade suas amostras, muito obrigado.

À minha companheira de todo o sempre Deborah, que durante todo o desenvolvimento desse trabalho me deu amizade, carinho, apoio e teve principalmente extrema paciência com meu mau humor relacionado ao estresse. Tê-la ao meu lado já se tornou essencial. Além disso, agradeço muuuito por ter sido a "designer" oficial dessa tese, mesmo de longe, coisa que sozinho eu não faria.

Aos chefes do LPT, Vinícius e Daniella, por terem sido sempre uma referência de liderança e profissionalismo e por me darem espaço para crescer sempre.

Ao Grupo de Chagas, principalmente à Juliana de Meis, que além de ser uma amiga, é também uma grande líder desse grupo e que me ajudou todo o tempo, obrigado por sua atenção especial, correção e revisão deste trabalho. A todas as outras componentes, especialmente Juliana Barreto e Danielle Santos, igualmente agradeço pela sua amizade e ajuda na execução do trabalho, bem como em todos os momentos de descontração.

Aos pesquisadores do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Ingo, Dumith, Déa, Désio, Fred, Adriana, Eliane, Arnon, Rudimar e Rafael. O que seria de mim se não tivesse aprendido com vocês.

À Leandra Lacerda, pela amizade e suporte nos experimentos piloto de biologia molecular.

À Banca examinadora, Drs. José Coura, Vinícius Frias, Alexandre Morrot e Fernanda Mariz, pelas contribuições representativas através de suas sugestões e críticas.

À Sidneia e Elaine, bem como Valmir e Celso pela eficiência profissional e socorro sempre que precisei, pelo cafezinho e bate papo, e amizade de sempre.

A todos os amigos do laboratório, timóцитos recém imigrantes, residentes e emigrantes, que não tenho como nomear, nem ordenar por importância por serem muitos, vitais e leais e que além da amizade e apoio, fazem do meu dia a dia no LPT ser ainda melhor. Marina Trajano e Ariany Oliveira, muito obrigado pelo suporte e companheirismo sempre.

Aos amigos extra-laboratoriais, Marcelo e Mônica, Antônio e Cecília, Fernando e Tânia, que, mesmo sem entenderem nada do que faço, sempre tiveram paciência e me deram todo apoio.

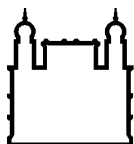
À Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela sua equipe competente e qualificada.

À FIOCRUZ, por ser uma referência mundial em ciência.

Às agências financiadoras do projeto, IOC, CNPQ, CAPES e CONICET (Argentina).

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade, é o a que devem tender os programas e os métodos de ensino." *Rui Barbosa.*

"A vida é apenas uma visão momentânea das maravilhas deste assombroso universo, e é triste que tantos se desgastem sonhando com fantasias espirituais." *Carl Sagan*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

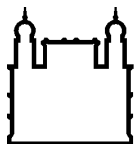
INTERAÇÕES IMUNOENDÓCRINAS NA MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS NA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA CRÔNICA: RELAÇÃO COM A CARDIOPATIA.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Luiz Ricardo Berbert

A doença de Chagas permanece sendo um grave problema de saúde pública nas Américas. Na fisiopatologia da doença, é observada uma intensa resposta imune, com alta produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas que contribuem para o tráfego de células ativadas para tecidos alvo. Este evento de migração celular pode estar relacionado à formação de cardiopatia chagásica nos indivíduos infectados. Um desequilíbrio na produção hormonal do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) foi observado em pacientes chagásicos, e, esse processo pode influenciar o sistema imune e possivelmente a gênese da cardiopatia. Nesse estudo, foi avaliada a resposta migratória de células T de pacientes chagásicos com diferentes formas de cardiopatia, correlacionando esses eventos com a produção de cortisol e DHEA ocorrida na fase crônica da doença. Primeiramente foi observado que TNF, IL-6, IFN- γ , IL-17, IL-10 e TGF- β são mais expressas de acordo com a gravidade da cardiopatia. Em paralelo a esse aumento de citocinas foi observado um desequilíbrio hormonal no eixo HPA com diminuição do hormônio DHEA sérico e aumento da razão Cortisol/DHEA circulantes. Além disso, foi observado um aumento da resposta migratória de células T, com fenótipo ativado (HLADR⁺/VLA-4⁺) sobre fibronectina, CXCL12 e TNF- α , e também combinados a um pré tratamento de DHEA e Cortisol destas células. Estes resultados indicam que distúrbios neuroendócrinos, correlacionados a um perfil inflamatório sistêmico, podem contribuir para aumentar o potencial migratório de células T aos sítios inflamatórios, incluindo tecido cardíaco, estando envolvidos na cardiopatia relatada na doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IMMUNENDOCRINE INTERACTIONS ON LYMPHOCYTE MIGRATION IN CHRONIC HUMAN CHAGAS DISEASE: RELATIONSHIP TO CARDIOPATHY.

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Luiz Ricardo Berbert

Chagas disease remains a serious public health problem in the Americas. In the pathophysiology of disease, it is observed an intense immune response with high expression of inflammatory cytokines and chemokines that contribute to activated T cells traffic, that target the inflamed tissue. These cell migration events may be related to the formation of Chagas heart disease in infected individuals. An imbalance in hormone production of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis (HPA) was observed in patients with Chagas disease, and this process could influence the immune system, including, cardiopathy formation. In this study, T cells migratory response from chagasic patients with different forms of cardiopathy was performed to correlate these events with cortisol and DHEA production in the chronic phase of the disease. Firstly, it was observed that inflammatory cytokines, such as TNF, IL-6, IFN- γ , IL-17, IL-10 e TGF- β were expressed in terms of disease severity. In parallel with cytokine enhancement, it was observed a hormonal imbalance in the HPA axis, where a decrease in hormone DHEA resulted in increased cortisol ratio / circulating DHEA. In addition, there was an increase in migratory response of T cells with an activated phenotype (HLADR⁺/VLA-4⁺) over fibronectin, CXCL12 and TNF- α , and also a combined pre treatment of DHEA and cortisol. These results indicate that neuroendocrine disorders correlated to a systemic inflammatory profile, can increase migration potential of T cells to inflammatory sites, including heart tissue and thus being involved in heart disease.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A Doença de Chagas	1
1.1.1 Distribuição geográfica e epidemiologia	1
1.1.2 Infecção e Manifestações Clínicas.....	3
1.1.3 Fisiopatologia e o Sistema Imune na Doença de Chagas	5
1.1.3.1 A migração linfocitária e a progressão da cardiopatia na doença.....	10
1.1.3.2 O eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, suas interações com o sistema imune e a modulação da migração de linfócitos	13
1.2 Justificativa	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Pacientes de estudo	19
3.2 Perfil endócrino e de citocinas dos pacientes:	19
3.3. Separação de células mononucleares (PBMCs) de sangue periférico.	20
3.4 Migração celular em câmaras Transwell®.	20
3.5 Citofluorimetria	21
3.6 Análise histológica do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de pacientes chagásicos crônicos e indivíduos controle	22
3.7 Análises estatísticas.	23
4 RESULTADOS	24
4.1 O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e um desequilíbrio no eixo Hipotálamo-adrenal estão diretamente	

	relacionados à gravidade da cardiopatia nos pacientes chagásicos crônicos.....	24
4.2	A migração de células T <i>ex vivo</i> é aumentada de acordo com a gravidade da cardiopatia dos pacientes chagásicos, através de diferentes estímulos.....	25
4.3	As populações de células T ativadas podem ser moduladas de acordo com o estímulo de migração e gravidade da cardiopatia nos pacientes.....	28
4.4	Hormônios relacionados ao eixo HPA podem modular a migração de PBMCs de indivíduos controle e cardíacos de acordo com suas concentrações.....	33
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	43
7	PERSPECTIVAS	44
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
9	ANEXOS	65
9.1	DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO CEDIDA AOS PACIENTES DO PRESENTE ESTUDO DE COLABORAÇÃO FIOCRUZ – UNIVERSIDADE NACIONAL DE ROSARIO.....	66
9.2	FICHA CLÍNICA DOS PACIENTES DE ESTUDO (FRENTE E VERSO) COM AVALIAÇÃO DO CARDIOLOGISTA RESPONSÁVEL.	67
9.3	8.3 DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE AMOSTRAS DE PACIENTES DO ESTUDO	69
9.4	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA REFERENTE À TESE DE DOUTORADO	70
9.5	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA REFERENTE AO PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO DA TESE DE DOUTORADO.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
Figura 2. Mapeamento de zonas de risco de infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> na Argentina.....	3
Figura 3. A migração de células T ao sítio inflamatório.....	11
Figura 4. Circuito neuroendócrino, o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal e sua relação com citocinas durante infecções chagásicas.....	14
Figura 5. Perfil de citocinas séricas, marcador de lesão e expressão de NO nos grupos de estudo.....	24
Figura 6. Perfil endócrino sérico nos grupos de estudo..	25
Figura 7. Análise histológica e imunofluorescência do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco dos grupos de estudo.	26
Figura 8. Análise do potencial migratório de PBMCs sobre estímulos quimiotáticos..	27
Figura 9. Imagens representativas de tamanho e granulosidade de PBMCs obtidas dos indivíduos controle e grupos de pacientes chagásicos crônicos	28
Figura 10. Perfil de expressão de CXCR4 e VLA4 ^{high} em células T totais.....	28
Figura 11. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 antes da migração <i>ex vivo</i>	29
Figura 12. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 após migração <i>ex vivo</i> com estímulo de fibronectina	30
Figura 13. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 após migração <i>ex vivo</i> com estímulo de CXCL12.	31
Figura 14. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 após migração <i>ex vivo</i> com estímulo de fibronectina e CXCL12.....	32
Figura 15. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 após migração <i>ex vivo</i> com estímulo de fibronectina e TNF- α	33
Figura 16. Análise do potencial migratório de PBMCs após pré tratamento com hormônios relacionados ao eixo HPA.	34
Figura 17. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 após migração <i>ex vivo</i> e pré tratamento de hormônios do eixo HPA.....	35
Figura 18. Mecanismos que sugerem uma regulação neuroimunoendócrina anormal em pacientes chagásicos crônicos.....	39

Figura 19. Esquema representativo das conclusões observadas do trabalho de tese..
.....43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de citocinas com expressão modulada durante infecção chagásica.....	9
---	----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico, do inglês *Adrenocorticotropic Hormone*.

APC – Aloficocianina, do inglês *Allophycocianin*.

AVP – Vasopressina.

BDASE - Bloqueio Divisional de ântero-superior Esquerdo.

BRE - Bloqueio do Ramo Esquerdo

BRD - Bloqueio do Ramo Direito

CCL2/MCP-1 - Ligante 2 da quimiocina C-C, do inglês *Chemokine (C-C motif) ligand 2* e proteína quimiotática de monócitos, do inglês *monocyte chemotactic protein 1*.

CCL3/MIP-1 - Ligante 3 da quimiocina C-C, do inglês *Chemokine (C-C motif) ligand 3* e proteína inflamatória e macrófagos, do inglês *macrophage inflammatory protein 1*.

CCL5/RANTES – Ligante 5 da quimiocina C-C, do inglês *Chemokine (C-C motif) ligand 5*, regulada na ativação, expressa e secretada por células T, do inglês *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*.

CCR5 – Receptor 5 da quimiocina C-C, do inglês *C-C chemokine receptor type 5*.

CD - grupo de diferenciação, do inglês *Cluster of Differentiation*.

CK-MB - Fração MB da Creatinofosfoquinase, do inglês *CreatinKinases MB*.

CXCL12 - Ligante 12 da porção CXC de quimiocinas, do inglês *Chemokine (C-X-C motif) Ligand 12*.

CXCR4 - Receptor para quimiocina CXCL12.

DHEA – Desidroepiandrosterona, do inglês *Dehydroepiandrosterone*.

DHEA-s - Desidroepiandrosterona-sulfato, do inglês *Dehydroepiandrosterone-sulphate*.

DTUs – Unidades de tipificação distintas, do inglês *Discrete Typing Units*.

ECG - Eletrocardiograma

ECM - Matriz extracelular, do inglês *Extracellular Matrix*.

ELISA – Ensaio Imunoenzimático, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.

FA – Fibrilação Atrial.

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína, do inglês *Fluorescein Isotiocyanate*.

GM-CSF –Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos, do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator*.

HLA DR - Antígeno leucocitário humano, do inglês *Human leukocyte antigen*.

HLC - Hormônio liberador de corticotrofina.

HVE - Hipertrofia Ventricular Esquerda
HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IFN- γ - Interferon gama
IgG – Imunoglobulina G.
IL- Interleucina.
IND - Indeterminado
NK - Células Matadoras Naturais, do inglês *Natural Killer*.
PBMCs – Células Mononucleares do Sangue Periférico, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*.
PBS – Salina tamponada de fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*.
PE – Ficoeritrina, do inglês *Phycoeritrin*.
PERCP - Proteína Clorofila Peridinina, do inglês *Peridin Chlorophil Protein*.
TCR - Receptor clonal de células T, do inglês *T Cell Receptor*.
Th – Células T Auxiliares, do inglês *T helper*.
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa , do inglês *Tumor Necrosis Factor Alfa*
Treg – Células T Reguladoras.
VLA4 - Antígeno de aparecimento tardio, do Inglês *Very Late Antigen*, $\alpha 4\beta 1$ ou CD49d/CD29, receptor de fibronectina e VCAM-1.
WHO – Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Chagas

1.1.1 *Distribuição geográfica e epidemiologia*

A Doença de Chagas é uma endoparasitose causada pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi* (Ordem Kinetoplastida – Trypanosomatidae) e é endêmica em toda América Latina. A Organização Mundial de Saúde relata que existem em torno de 6-8 milhões de humanos infectados e mais de 100 milhões em risco de infecção (WHO, 2014), conforme representado na figura 1. A infecção clássica é causada pelas fezes contaminadas do inseto vetor conhecido como Barbeiro (Ordem Hemiptera – Reduviidae) e em alguns casos pela via transplacentária (Dias et al., 2000); mas também há outras vias não clássicas e acidentais como transfusão sanguínea, transplante de órgãos, e acidentes laboratoriais, além da possível contaminação via sexual (Lenzi et al., 1998; Cabrine-Santos et al., 2003). Recentemente, a transmissão via oral tem sido relatada na região amazônica e outras regiões isoladas no Brasil, sendo uma das principais vias de contaminação (Steindel et al., 2008; Yoshida et al., 2009; Shikanai-Yasuda et al., 2012; De Meis et al., 2013; Souza-Lima et al., 2013; Coura, 2014).

Atualmente, devido às imigrações de indivíduos infectados em áreas não endêmicas, a doença tem se espalhado pela Europa (Strasenet al., 2014), Estados Unidos e Canadá (Fearon et al., 2013; Chin et al., 2013), bem como Japão e Austrália (Gascon et al., 2010), podendo se tornar um problema de saúde pública nestes locais. Em geral, a infecção em áreas não endêmicas se caracteriza por contaminações acidentais, como transfusões de sangue, e neonatos de mães imigrantes infectadas (Schmunis & Yadon, 2010), bem como turistas que ingerem acidentalmente o protozoário em alimentos contaminados (Shikanai-Yasuda et al., 2012).

No Brasil, as áreas endêmicas estão localizadas nas regiões centro-norte e nordeste, porém, há diversos casos diagnosticados em todo país, com estimativa de 2-3 milhões de pessoas infectadas (Martins-Melo et al., 2013).

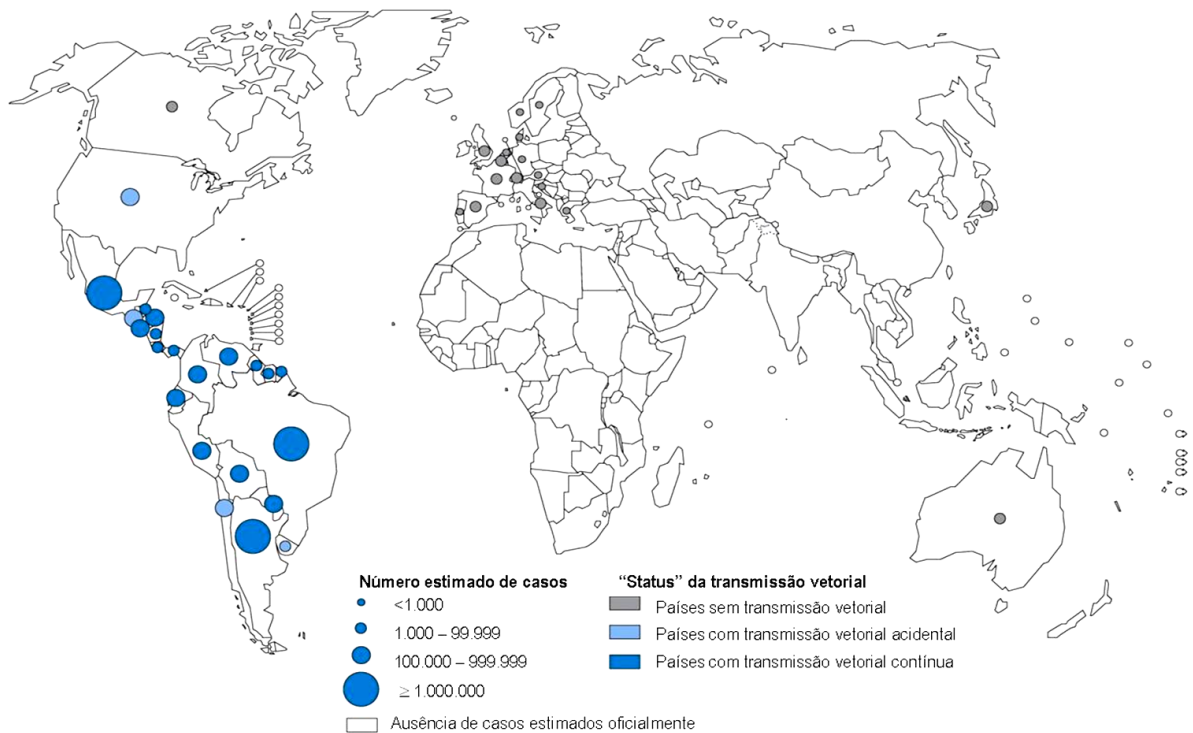


Figura 1. Distribuição mundial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. O mapa epidemiológico demonstra a endemicidade da infecção na América Latina. A imigração de indivíduos infectados para regiões não endêmicas resulta no aparecimento de casos de infecção chagásica acidental em locais onde antes não se conhecia clinicamente a doença (WHO, 2014).

Na Argentina, país de origem dos pacientes deste estudo, estima-se que há em torno de um milhão e meio de pessoas infectadas (Beloscar, 2013), principalmente pela via vetorial, seguida da via congênita, devido às condições sanitárias em algumas províncias, como Santa Fé (Fig. 2).

A doença de Chagas possui três ciclos bem definidos e intimamente relacionados entre si: o ciclo selvagem, o ciclo peridoméstico e o ciclo doméstico. Essa característica da doença exige abordagens de vigilância do vetor e seus hospedeiros/reservatórios para o controle de incidência da doença em uma determinada região. Dentre as principais abordagens estão: o controle populacional do inseto vetor, a identificação de reservatórios e o gerenciamento do trânsito de indivíduos infectados de áreas endêmicas para não endêmicas, através de diagnósticos mais rápidos e eficientes. Esse controle pode ser eficaz na interrupção do ciclo de transmissão do parasita ao homem, porém, devido às inúmeras variáveis ambientais como a existência de diferentes ciclos, a erradicação da doença se torna bastante difícil (Coura, 2013; Coura et al., 2014).

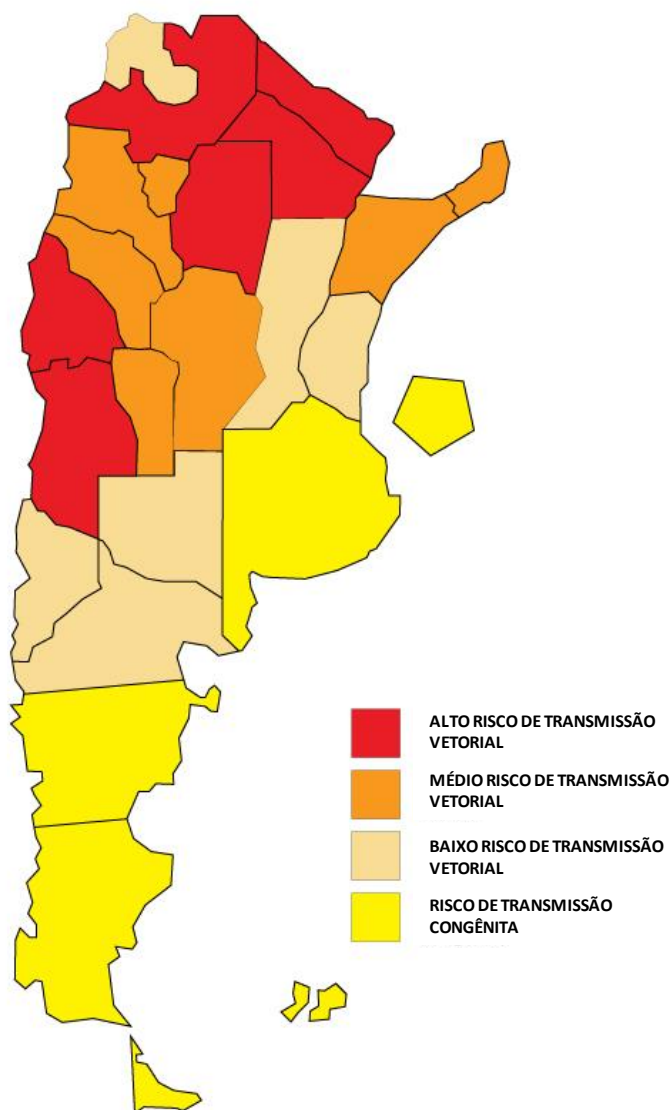


Figura 2. Mapeamento de zonas de risco de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na Argentina. O mapa demonstra que todo território argentino é susceptível à infecção chagásica, principalmente pelas vias vetorial e congênita. Modificado a partir de Beloscar et al., 2013.

1.1.2 Infecção e Manifestações Clínicas

O hospedeiro humano infectado pelo parasita passa por duas fases clínicas bem caracterizadas da doença, aguda e crônica. A fase aguda se inicia após a contaminação do hospedeiro pelas fezes do inseto vetor contaminado, onde ocorre uma reação inflamatória conhecida como Chagoma de inoculação que pode se desenvolver para uma forma mais grave com edema e linfadenopatia local (Sinal de Romaña) em torno de 7-14 dias (Revisado por Rey, 2002). Após esse período seguem outras manifestações como febre, cefaléia, anorexia, vômitos, diarréia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e alta parasitemia devido à extensa

multiplicação de amastigotas no organismo, liberando tripomastigotas no sangue (Tanowitz et al., 1992; Revisado por Coura et al., 2013).

Uma manifestação clínica importante da fase aguda é a cardite associada a um elevado parasitismo das células do miocárdio. A presença do parasita no tecido leva a uma intensa resposta inflamatória de células T no sítio inflamado, destruindo células infectadas e não infectadas (Luppiet al., 1998; Dias et al., 2000). A infecção, juntamente com a intensa resposta inflamatória, induz a morte de células teciduais por fibrose e apoptose (Tostes, 2005). Pacientes infectados (3-5%) podem sofrer óbito nessa fase da doença devido às complicações da miocardite e meningoencefalites, mas a maioria se recupera em 3-4 meses (Sanchez & Ramirez, 2012; Coura et al., 2002). Em muitos casos (cerca de 50 - 70%, de acordo com a cepa de *T. cruzi* e a resistência do hospedeiro) a doença se torna assintomática e latente após a fase aguda, tendo um prognóstico incerto ou não evoluindo para fase crônica (Vitelle-Alvelar, 2006).

A fase crônica pode ser assintomática ou apresentar-se, em torno de 30% dos casos, como morbidade, caracterizada por parasitemia subpatente, cursando com cardiomiopatia, síndromes de megacólon e/ou megaesôfago, e alterações fisiológicas em outros sistemas. As patologias observadas na fase crônica são resultantes da intensa atividade inflamatória mediada por células T nesses tecidos e pela persistência de antígenos parasitários nos tecidos (Tanowitz, 2002; Savino, 2007). A cardiomiopatia chagásica crônica é uma das manifestações mais importantes na doença e a principal causa de morte nos pacientes após um processo de cardiomegalia, arritmia e falência do órgão (Higuchi, 2003).

Diversas abordagens terapêuticas têm sido sugeridas e também administradas em pacientes com cardiopatia crônica com objetivo de eliminar o parasita e prevenir ou reduzir a fibrose e a lesão no tecido. De acordo com Coura & Borges-Pereira (2011 e 2012), a quimioterapia sistêmica específica, utilizando Nifurtimox e Benznidazol, tem se mostrado eficaz no tratamento de casos agudos originados de diversas vias de infecção, bem como em casos indeterminados e crônicos, porém, resultando em efeitos colaterais dose-dependentes em muitos casos. Neste contexto, e levando em conta questões sócio-econômicas na produção e distribuição destes medicamentos, ainda há muitos desafios e perspectivas em um tratamento padrão e economicamente viável para a doença (Dias et al., 2014).

Atualmente, com os avanços da biotecnologia, novas drogas estão em produção para tratamento e prevenção da doença. A tioridazina tem se mostrado

promissora no tratamento de modelos murinos com cardiopatia aguda e crônica, reduzindo a mortalidade e os danos teciduais nos modelos (Lo Presti et al., 2015), e o CYP51, que inibiu o crescimento do parasita (Keenan & Chaplin, 2015). Abordagens com terapia celular, como transplante de células da medula óssea de modelos murinos, também tem sido testados com eficácia (Guimarro et al., 2014; Jasmim et al., 2014), restaurando a rede de fibras no tecido cardíaco. Beta bloqueadores, como Carvedilol, têm diminuído a insuficiência cardíaca em pacientes chagásicos (Hidalgo et al., 2012; Ribeiro et al., 2012) e aumentando a sobrevida de modelos experimentais (Pimentel et al., 2012).

Tratamentos com o hormônio DHEA têm sido testados em outras enfermidades parasitárias em modelos experimentais, modulando a resposta imune, resultando em efeitos protetores no organismo (Caetano et al., 2011). Dentre esses efeitos, estão a redução de parasitas circulantes e diminuição das concentrações de TNF em modelo murino (Filipin et al., 2010; Santos et al., 2007 e 2010), aumento da resposta linfoproliferativa e da atividade de óxido nítrico (Caetano et al., 2009).

1.1.3 Fisiopatologia e o Sistema Imune na Doença de Chagas

Atualmente, há um consenso de que a resposta imune do hospedeiro induz a diversos eventos complexos que possam controlar o parasitismo enquanto preservam o potencial de montar e manter uma longa resposta celular e humoral contra o patógeno durante a infecção pelo *T. cruzi* (Revisado por Sathler-Avelar, 2009). No curso dessa infecção, são observadas diversas alterações no sistema imune e a evolução desses mecanismos depende inicialmente das características genéticas do hospedeiro (Kierszbaum & Szein, 1990), carga do inóculo (Borges, 2013; Lemos, 2013) e cepa do parasita (Cruzet al., 2014; Duz et al., 2014; Evans-Osses et al., 2014; Meza et al., 2014; Poveda et al., 2014), ressaltando que o agrupamento de cada cepa de *T. cruzi* nas DTUs (Di Noia et al., 2002) leva em consideração se a heterogeneidade e multiclonalidade dessas cepas determinam variações nos aspectos clínicos da doença (Devera et al., 2003). Por outro lado, a ausência de patologias clínicas durante a infecção em alguns indivíduos está diretamente associada com a habilidade de controle dos mecanismos envolvidos na resposta imune contra o parasita. Porém, esse mesmo controle pode contribuir, na evolução da infecção, com danos teciduais associados ao intenso infiltrado inflamatório leucocitário no tecido alvo (Fuenmayor et al., 2005).

A resposta ao parasita se inicia com a entrada do *T. cruzi* no hospedeiro, e com o reconhecimento do tripomastigota pelo sistema imune, podendo gerar três eventos básicos: 1) a detecção e destruição direta do parasita por células do sistema inato e proteínas do complemento; 2) a ativação de células apresentadoras de antígeno como as dendríticas e macrófagos, estimulando a resposta por células T desencadeando a resposta adaptativa; 3) a sensibilização de células não hematopoiéticas que seriam alvos primários na invasão do parasita (Revisado por Tarleton, 2007). Estudos recentes demonstraram que a porta de entrada do parasita também pode modular o sistema imune, tendo sido demonstrado que a infecção oral induz a uma resposta local, através da modulação de mecanismos do sistema imune relacionados à mucosa, em contraparte à infecção intraperitoneal, que induz a uma resposta mais sistêmica (De Meis et al., 2013).

Em um primeiro momento, macrófagos, iniciam uma ação microbicida produzindo IFN- γ e TNF- α bem como ativação de células Natural Killer (NK) através da ação de IL-12 sobre células T CD4, estimulando a produção de óxido nítrico e IFN- γ por células NK, que contribuem para o controle inicial da infecção (Lima-Martinset al., 1985; Gazzinelli et al., 1993); macrófagos e células NK evoluem para fenótipos bem distintos durante o curso da fase aguda, antes do início da resposta mediada por células T (Vitelli-Alvelar et al., 2006), e este evento teria relação direta com as respostas futuras, já que sua expansão exacerbada na doença pode contribuir para eventos pró-inflamatórios. Sendo assim, a modulação de mecanismos imunoreguladores se torna determinante para prevenir os efeitos deletérios associados com a excessiva resposta inflamatória que estão associados às morbidades características da doença (Gomes et al., 2014).

Células T reguladoras (Treg) com fenótipo CD4/CD25^{high} são importantes no controle de doenças autoimunes mediadas por células T, bem como na expansão descontrolada de células responsivas a patógenos (Piccirillo et al., 2008). Durante a infecção pelo *T. cruzi*, foram relatadas que a frequência células Treg em pacientes com forma indeterminada da doença está relacionada com a progressão de danos cardíacos (Vitelli-Alvelar et al., 2005 e 2006; Sanoja et al., 2013; De Moura-Braz et al., 2014; Gonzalez et al., 2014); dados obtidos em modelos experimentais em nosso laboratório demonstraram que a infecção pode gerar distúrbios na geração e exportação de células Treg naturais (Hamaty, 2008). Há também, outros possíveis mecanismos imunoreguladores que contribuem na patogênese da doença, mas dependem da cepa de *T. cruzi* da qual o hospedeiro foi infectado, como a IL-18, que

regula a produção de IFN- γ em modelo murino, promovendo uma resposta Th1 pro inflamatória, em contraparte ao modelo IL-18^{-/-} (Esper et al., 2014). A citocina IL-17 é importante indutora da produção de IL-6, TNF- α e GM-CSF em macrófagos, e, na ausência desta molécula em modelo murino nocaute foi observado aumento dos danos teciduais característicos da infecção (Miyazaki et al., 2010). Por outro lado, o aumento da expressão de IL-17 por células T em pacientes indeterminados também está associado ao status clínico e funcionamento cardíaco, podendo ser um fator de prevenção aos danos cardíacos (Magalhães et al., 2013). Na fase aguda da infecção, em modelos experimentais, observa-se uma intensa ativação policlonal de células T e B em órgãos linfóides periféricos persistindo até a fase crônica da doença (Minoprio et al., 1986; Da Silva et al., 1998). No que diz respeito às células B, além de seu papel na produção de anticorpos específicos durante a infecção chagásica, foi descrita uma alteração na sua distribuição sistêmica durante a fase crônica da infecção humana, relacionado diretamente às alterações funcionais em células T (Fernandez et al., 2014). Células T CD8 têm fundamental importância na geração da cardiopatia, sendo efectoras na indução de morte de células infectadas e levando a danos teciduais no tecido cardíaco, mas seu papel pode ser antagônico, dependendo do equilíbrio populacional entre os subtipos destas células, tendo um grupo produtor de IFN- γ (IFN^{HIGH}) e outro produtor de perforina que por sua vez modulam a citotoxicidade específica nos modelos murinos (Silverio et al., 2012). Tão importante é a importância das células T CD8 na evolução da patogênese chagásica, que essa subpopulação pode ser utilizada experimentalmente como modelo de vacinação para redução de sintomas da doença, já que pode ser induzida a uma resposta específica a transialidases do parasita, minimizando danos teciduais aleatórios e não específicos (Dos Santos et al., 2014). Neste contexto de frequência de subpopulações leucocitárias, já foi relatada também a presença de células T duplo positivas para CD4 e CD8 ativadas e com potencial efector autoreativo, em pacientes crônicos (Giraldo et al., 2011).

Um ponto amplamente discutido na patogênese da doença, principalmente em relação à miocardite crônica, é a geração de autoimunidade que pode ser resultante da persistência de antígenos parasitários circulantes oriundos de danos ocorridos nos tecidos (Kalil & Cunha-Neto, 1996), bem como à presença de peptídeos de *T. cruzi* com sequências homólogas à sequências protéicas do hospedeiro, como por exemplo a miosina cardíaca (Cunha-Neto et al., 1995). Porém, essa hipótese tem sido amplamente discutida e questionada por alguns autores,

uma vez que os danos ao tecido cardíaco podem ser resultantes da presença do parasita no local, que levam a uma reação inflamatória mediada por células T CD8 parasito-específicas (Marin-Neto et al., 2007). A possível participação de auto anticorpos foi demonstrada na detecção de auto anticorpos anti EVI (Endocardial Vascular Interstitial Tissue) em soro de pacientes chagásicos que reagem contra o próprio endocárdio desses pacientes (Cossio et al., 1974). Alguns destes auto anticorpos têm alvos específicos, atingindo neurônios do tecido cardíaco, ou a cadeia pesada de miosina, alterando substancialmente as funções cardíacas (MacLean et al., 2014). Células T CD4 têm um papel importante na reação contra o músculo cardíaco como demonstrado por Ribeiro-dos-Santos (1990,1991,1992), onde foi observado que os danos teciduais em corações de camundongos crônicos eram semelhantes aos danos de pacientes transplantados.

Em relação à produção de citocinas (Tabela 1) durante a infecção, estudos apontam para uma deficiência na quantidade de expressão de IL-2 bem como na expressão da cadeia α de seu receptor (CD25) na superfície de linfócitos, inibindo a resposta proliferativa de células T (Tarleton et al., 1988). Por outro lado, citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-6 e IL-12 tem sua expressão aumentada em tecidos, resultado da intensa inflamação local (Tarleton et al., 1991; Tanovitz et al., 1992). A infecção pelo *T. cruzi* pode induzir uma resposta com perfil Th1 que consiste na alta produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12, aumentando a capacidade microbicida de macrófagos. No entanto, alguns modelos experimentais demonstraram desequilíbrio na produção dessas citocinas durante a infecção aguda e crônica, e esse mecanismo pode induzir uma resposta com perfil Th2, com produção de IL-4 e IL-10, aumentando a susceptibilidade do modelo à infecção. Em pacientes, a relação entre um perfil clínico indeterminado (sem alterações cardíacas) e um mais grave pode ser representada por um equilíbrio responsivo do hospedeiro contra o parasita, caracterizado por um balanço anti-inflamatório na fase indeterminada, com alta produção de IL-10, em relação à alta expressão de IFN- γ , TNF- α e IL-6 na fase clínica cardíaca (Dutra et al., 2014; Souza et al., 2014). A alta expressão dos receptores de algumas citocinas, como CCR5 e CXCR3 por células T de pacientes, também está associada ao status clínico (indeterminado – cardíaco) e ao perfil de resposta imune, por facilitarem o tráfego de células T efetoras (Gomes et al., 2005).

Tabela 1. Perfil de citocinas com expressão modulada durante infecção chagásica.

CITOCINA	CÉLULA PRODUTORA	PAPEL	MODELO	REFERÊNCIAS
CCL-2	Endotélio Epitélio Fibroblastos	Recrutamento de monócitos, células T e células Dendríticas aos sítios de inflamação	Murino ↑ humano ↑	<i>Talvani et al., 2004;</i> <i>Paiva et al., 2009</i>
CCL-4	Células T	Recrutamento de células NK e monócitos	Murino ↑	<i>Sullivan et al., 2011;</i> <i>Marino et al., 2005</i>
CCL-5	Células T	Recrutamento de leucócitos e ativação de células NK	Murino ↑	<i>Sullivan et al., 2011;</i> <i>Marino et al., 2005</i>
CXCL12	Células Estromais	Indução de <i>Homing</i> de linfócitos	Murino ↑	<i>Mendes-da-Cruz et al., 2006</i>
IFN- γ	Células T Células NK	Ativação de macrófagos e supressão de células Th2	Humano ↑ murino ↑	<i>Pérez et al., 2011;</i> <i>Reis Machado et al. 2014</i>
IL-10	Células B Células T Macrófagos	Supressão de macrófagos	Humano ↑ murino ↑	<i>Pérez et al., 2011;</i> <i>Reis Machado et al. 2014</i>
IL-12	Células B Macrófagos	Ativação de células NK e indução de células CD4 para Th1	Murino ↑	<i>Tarleton et al., 1991;</i> <i>Kuehn et al., 2014</i>
IL-17	Células T CD4 de memória	Indução de produção de citocinas pelo epitélio e fibroblastos	Humano ↑ murino ↑	<i>Pérez et al., 2011;</i> <i>Cobb et al., 2012</i>
IL-2	Células T	Proliferação de células T	Murino ↓	<i>Tarleton et al., 1988;</i> <i>Gomez-Garcia et al., 2005</i>
IL-4	Células TMastócitos	Ativação de células B e Supressão de células Th1	Humano ↑ murino ↑	<i>Pérez et al., 2011;</i> <i>Gomez-Garcia et al., 2005</i>
IL-5	Células T Mastócitos	Crescimento de diferenciação de eosinófilos	Murino ↓	<i>Tarleton et al., 1991</i>
IL-6	Células T Macrófagos Céls. endoteliais	Indução de crescimento e diferenciação de células T e B	Humano ↑	<i>Pérez et al., 2011;</i> <i>Poveda et al., 2014</i>
TGF- β	Células T Condrocitos Monócitos	Inibição de crescimento celular, indução de secreção de IgA	Humano ↑	<i>Pérez et al., 2011;</i> <i>Rocha-Rodrigues et al., 2012</i>
TNF- α	Macrófagos Células NK Células T	Mediador de inflamação local e ativação de endotélio	Humano ↑	<i>Talvani et al., 2004;</i> <i>Pérez et al., 2011</i>

A tabela mostra as principais citocinas com expressão modulada durante infecção chagásica, correlacionando esta expressão com a formação de um ambiente propício à ativação e migração de células.

Alterações estruturais e fisiológicas também podem ser observadas em órgãos linfóides, particularmente em camundongos. O aumento de volume no baço e linfonodos subcutâneos foi observado na fase aguda da infecção, resultante da

ativação policlonal e proliferação celular nesses órgãos (Minoprio et al., 1986; De Meis et al., 2009). Já em linfonodos mesentéricos, ocorre efeito inverso, onde há intensa atrofia devido à apoptose dos linfócitos (De Meis et al., 2006). Os subtipos de células T encontrados nos linfonodos e baço incluem modificações fenotípicas, em seus repertórios de TCR e também em seus marcadores de ativação, apresentando maior densidade de CD69 e menor densidade de CD62L (Leite-de-Moraes et al., 1994; Cotta-de-Almeida et al., 2003; Mendes-da-Cruz et al., 2006). O timo também é um órgão alvo na infecção pelo *T. cruzi* (Savino, 2006), sofrendo diversas alterações no curso da patologia. Sendo um órgão gerador de células T, essas alterações podem estar envolvidas em aspectos distintos da fisiopatologia da doença. Em modelos experimentais, durante a fase aguda, esse órgão sofre uma intensa atrofia que se estende no decorrer da doença até a fase crônica e esse evento é causado principalmente pela depleção maciça de timócitos com fenótipo CD4/CD8 por apoptose, reduzindo então a região cortical do órgão (Savino et al., 1989; Leite-de-Moraes et al., 1991,1992; Martins et al., 1994). Esses mesmos timócitos autoreativos, durante a fase aguda da infecção, passam pela seleção negativa e podem adquirir um fenótipo com potencial autoimune, migrando para órgãos linfoides periféricos e levando a danos nos sítios inflamatórios (Morrotet al., 2012). Durante a infecção aguda de modelo murino, outras moléculas também têm expressão alterada e podem induzir efeitos deletérios no timo, principalmente as caspases 8 e 9, que induzem apoptose de timócitos, após estimulação pelas altas taxas de glicocorticoides liberadas sistemicamente na infecção (Farias de Oliveira et al., 2013). Em um contexto de fisiologia celular durante o curso da doença, a migração linfocitária aos sítios inflamatórios é um dos eventos mais importante na geração da patogênese cardíaca; as populações celulares que chegam ao sítio inflamatório produzem principalmente IFN- γ e TNF- α , gerando um perfil tipo Th1, que, por sua ação pró inflamatória, induz a lesões no tecido cardíaco de pacientes (Rocha Rodrigues et al., 2012), conforme discutido a seguir.

1.1.3.1 A migração linfocitária e a progressão da cardiopatia na doença

A migração celular aos sítios inflamatórios é modulada por processos biológicos como recrutamento, rolamento, ancoramento, adesão, migração transendotelial, extravasamento da membrana basal e posicionamento celular, via sinalização de citocinas, e seus respectivos receptores nas células do sistema imune

(Lannes-Vieira, 2003 et al., Ley et al., 2007; Sigmundsdottir & Butcher et al., 2008), como demonstrado na figura 3.

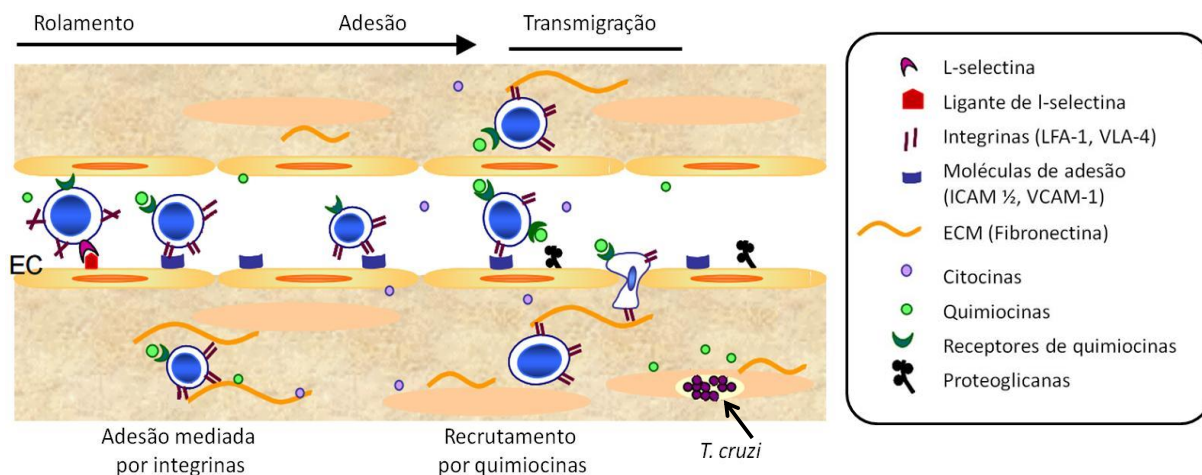


Figura 3. A migração de células T ao sítio inflamatório. Esquema representativo dos eventos de migração celular a um sítio inflamatório, como rolamento, adesão e transmigração, demonstrando o papel de citocinas, seus ligantes e proteína de ECM como a fibronectina no processo. Modificado a partir de Lannes-Vieira, 2003.

A citocina CXCL12, produzida por células do estroma de tecidos é um importante fator de recrutamento de células T, e tem sua expressão aumentada durante infecção murina com *T. cruzi* (Mendes-da-Cruz et al., 2006), e associada à fibronectina, proteína de matriz extracelular altamente expressa em tecidos infectados pelo parasita, pode promover o aumento do potencial migratório de tímócitos no timo durante este evento fisiopatológico (Savino et al., 2002; Cotta de Almeida et al., 2003). Estas mesmas citocinas produzidas de forma autócrina, em paralelo com a alta expressão de fibronectina no tecido, estimulam em células TCD4 a expressão de CXCR4 (receptor para a quimiocina CXCL12), e da integrina VLA-4 (receptor para fibronectina) a qual facilita a migração e infiltração dessas células nos sítios inflamados em modelos murinos infectados (Cotta de Almeida et al., 2003).

As citocinas TNF- α e IFN- γ , por exemplo, além de estarem envolvidas no controle da infecção, também podem determinar o tráfego seletivo de células do sistema imune para sítios de reatividade no miocárdio (Silva-Barbosa et al., 1997; Reis et al., 1997; Higushi et al., 2003). Neste sentido, foi observado que em animais deficientes para ambos os receptores de TNF- α (TNFRSF1A e TNFRSF1B) são incapazes de gerar o influxo de células inflamatórias ao miocárdio durante a infecção aguda (Perez et al., 2007). Da mesma forma, a associação entre TNF- α e a molécula de matriz extracelular fibronectina, estimula a migração *ex vivo* de células T oriundas de pacientes chagásicos crônicos (Berbert et al., 2012). Também importantes no

processo, as citocinas CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1, e seu receptor CCR5, altamente expresso em células T humanas ativadas na infecção chagásica crônica, concomitantemente com CXCR4, podem servir como marcadores de evolução da doença, já que sua expressão nas células aumenta seu influxo no tecido cardíaco (Marino et al., 2005). Já a alta expressão de CCL2/MCP-1 no tecido cardíaco de camundongos, e pode atuar no controle da carga parasitária, já que em modelos murinos nocautes para essa citocina, a parasitemia é mais baixa em relação aos controles infectados, e da infiltração e ativação de células T e monócitos nos sítios inflamatórios (Paiva et al., 2009). A ação combinada entre outras citocinas e moléculas de matriz extracelular é capaz de aumentar o potencial migratório de células T em situações fisiológicas (Savino et al., 2004; Ivanoff et al., 2005) e patológicas (Savino et al., 2007; Gameiro et al., 2010; Pérez et al., 2012). O *T. cruzi* também pode alterar a adesão e migração de timócitos e a liberação de células duplo-positivas CD4⁺CD8⁺ com potencial autoreativo no sistema, e esse desbalanço no microambiente do timo é causado pelo aumento de expressão de fibronectina no tecido infectado e seu receptor VLA-4 pelas células T duplo positivas, gerando uma frequência de população celular com fenótipo de potencial auto reativo em órgãos linfoides periféricos, como baço e linfonodos (Cotta de Almeida et al., 2003). Essa população duplo positiva expressa segmentos de TCR proibidos (TCRVbeta5 e TCRVbeta12), que são deletados no timo em situações fisiológicas normais de seleção celular (Mendes da Cruz et al., 2006). Essa modulação no microambiente tímico pode ser gerada pela secreção de trans sialidase (enzima expressa na membrana de tripomastigotas que auxilia na infecção celular) pelo parasita, que por sua vez afeta a dinâmica intratímica dos timócitos interferindo na diferenciação e sinalização intracelulares, e a conseqüente migração celular para a periferia (Nardy et al., 2012). Cabe ressaltar que este escape prematuro de timócitos pode estar relacionado com a frequência de células CD4 ou CD8 HLADR⁺ encontradas em sangue periférico de pacientes crônicos (Morrot et al., 2013).

Tomados em conjunto, os dados apresentados definem que interações entre a alta expressão de citocinas, associadas a um desbalanço na rede de ECM como a fibronectina durante a infecção chagásica, pode promover o aumento do potencial migratório de células T ativadas. Essas interações quimiotáticas também são moduladas por outros sistemas, principalmente, os sistemas nervoso e endócrino, como descrito a seguir.

1.1.3.2 O eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal, suas interações com o sistema imune e a modulação da migração de linfócitos

O eixo HPA (Hipotálamo – Pituitária – Adrenal), exerce um papel fundamental na resposta a estímulos internos e externos, principalmente a agentes indutores de estresse. A atividade do eixo HPA (Fig. 4) é governada pela secreção de hormônio liberador de corticotrofina (HLC) e vasopressina (AVP) pelo hipotálamo, ativando a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela pituitária, que por sua vez estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal. Os glicocorticóides, então, interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o próprio eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição negativa por *feedback* da secreção do ACTH pela pituitária e do HLC a partir do hipotálamo (Juruena et al., 2004). Durante a resposta inflamatória, as citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 modulam a maioria dos eventos de *feedback* na regulação do eixo, e podem, por sinergia, estimular a liberação de ACTH do hipotálamo e da pituitária levando ao aumento de produção de glicocorticóides, contrabalançando a resposta inflamatória. Deste modo, desequilíbrios no funcionamento do eixo HPA, como a alta produção de glicocorticóides associada à alta expressão de citocinas inflamatórias, podem resultar em maior susceptibilidade de indivíduos à doenças inflamatórias (Revisado por Ader, 2007).

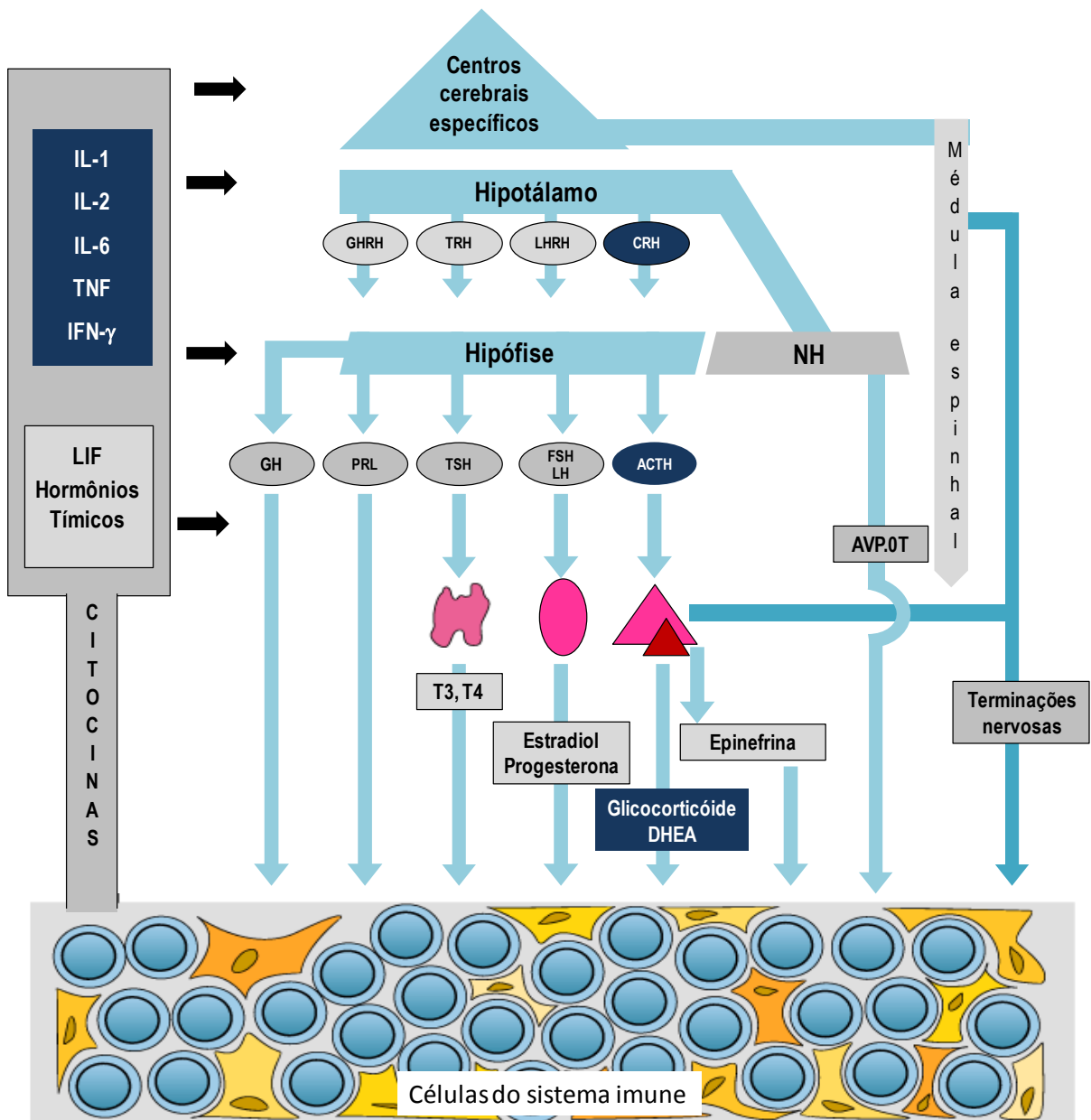


Figura 4. Circuito neuroendócrino, o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal e sua relação com citocinas durante infecções. Esquema representativo demonstrando ativação do eixo HPA a partir de um processo infeccioso, a produção subsequente de cortisol e DHEA, e o *feedback* de reativação do eixo por citocinas relacionadas a processos inflamatórios. Em azul escuro, hormônios e citocinas relacionados ao eixo HPA. Em azul claro, estruturas do sistema neuroendócrino relacionadas ao eixo HPA. ▲ Glândulas suprenais. Adaptado e modificado a partir de Savino & Dardenne, 1995.

Respostas imunes inata e adaptativa estão sujeitas a influências regulatórias provenientes de outros sistemas, em especial o neuroendócrino. Nesse contexto a resposta endócrina poderia ter então relevância fundamental na coordenação dos mecanismos de resistência, seja na ativação e migração de células, seja na regulação de mecanismos intracelulares, podendo incidir desse modo no curso da Doença de Chagas. Trabalhos anteriores de nosso grupo e outros já demonstraram que há uma intensa relação entre o sistema imune e o eixo HPA, a migração celular (Savino et al., 2010; Savino et al., 2012), bem como a evolução de

comprometimento cardíaco em pacientes crônicos (Perez et al., 2011). Nestes trabalhos prévios, em camundongos infectados, foi observada estase vascular, aumento na expressão de fibronectina e laminina, bem como infiltrado de macrófagos nas glândulas pituitária e adrenal de modelos murinos infectados (Corrêa de Santana et al., 2006) e, este processo pode desencadear uma produção desequilibrada de glicocorticóides. No contexto da migração celular, interações entre hormônio de crescimento e microambiente tímico podem resultar em aumento da produção de ECM (fibronectina e laminina) e CXCL12, promovendo a migração de timócitos (Savino et al., 2002 e 2012). Em modelos murinos, já foi descrito que a infecção pelo *T. cruzi* pode modular diretamente a produção de hormônios relacionados ao eixo HPA, já que o DNA do parasita foi detectado no tecido das glândulas Hipotálamo e adrenal (Corrêa-de-Santana et al., 2009) levando a um evento pró inflamatório, com produção de TNF e IL-6 exacerbada levando à hiperatividade do eixo HPA por *Feedback*, com aumento nos níveis circulantes de corticosterona, sem contudo alterar os níveis de ACTH e DHEA (Villar et al., 2013; Lepletier et al., 2013); vale ressaltar que modulação semelhante foi descrita em pacientes crônicos, onde se apresentou aumento na razão Cortisol/ DHEA de acordo com a gravidade de comprometimento cardíaco (Pérez et al., 2011). O aumento na produção de glicocorticoides como a corticosterona é importante no controle da resposta inflamatória e na sobrevivência de modelos murinos infectados, uma vez que adrenalectomia ou bloqueio dos receptores de glicocorticoides durante a infecção aguda culminou no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos animais infectados em associação com aumento na mortalidade desses animais (Roggero et al., 2006; Pérez et al., 2007). Células Treg também podem ser moduladas pela expressão exacerbada de glicocorticoides na infecção chagásica, já que em modelos murinos o tratamento com glicocorticoides e IL-2 aumentou a frequência da população de células T reguladoras concomitante com a produção de IL-4 e IL-10, gerando efeito protetor aos modelos contra a infecção (Gonzalez et al., 2014). O timo, sendo gerador de células T, também é afetado com o desequilíbrio na produção de hormônios do eixo HPA, e estudos prévios demonstraram que o aumento na produção de glicocorticóides e diminuição de níveis de prolactina durante infecção chagásica aguda, levam à morte de timócitos por apoptose e consequente atrofia tímica (Lepletier et al., 2012).

Situações de estresse crônico em humanos levam ao prolongamento da resposta de hormônios efetores (glicocorticóides e catecolaminas) que pode

macarretar em efeitos deletérios ao organismo, como a hipercortisolemia crônica que compromete diversas funções biológicas, incluindo metabolismo e morte celular, crescimento, resposta imune, desenvolvimento da personalidade e comportamento (Chrousos et al., 2009). A produção de DHEA em resposta ao estresse inflamatório pelas glândulas supra renais, foi descrita como tendo efeito protetor e imunomodulatório em modelo murino infectado por *T. cruzi*, onde o tratamento com DHEA em macrófagos e modelos murinos infectados, reduziu a parasitemia na fase aguda (Dos Santos et al., 2005) aumentou a produção de citocinas anti inflamatórias, como IL-10 e IL-4, (Caetano et al., 2011) e aumentou a produção de IFN e óxido nítrico em células (Brazão et al., 2010).

1.2 Justificativa

A Doença de Chagas crônica grave pode desenvolver uma intensa cardiopatia. A geração desta cardiopatia está associada a elevada produção de citocinas séricas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-6 e CXCL12, entre outras (Pérez et al., 2011). A resposta inflamatória no tecido cardíaco está associada à fibrose, alta produção de proteína de matriz extracelular como a fibronectina que participa do processo de migração de células T ativadas ao tecido inflamado (Savino et al., 2002; Cotta de Almeida et al., 2003).

Citocinas como TNF- α e IL-6, por sua vez, estão relacionadas também à ativação do eixo HPA (Savino & Dardenne, 1995). Estudos anteriores demonstraram que a infecção aguda pelo *T. cruzi* estimula o eixo HPA, ativa a alta produção de glicocorticóide sistêmico e promove um desequilíbrio na razão glicocorticóide/ DHEA. O DHEA tem se mostrado como potencial candidato no tratamento da infecção aguda em modelos murinos, já que o tratamento com esse hormônio gerou efeito protetor nos modelos infectados (Caetano et al., 2011). No entanto, não existem dados relativos ao papel de DHEA sobre a migração de células T e seu impacto no desenvolvimento da Cardiopatia Chagásica Crônica. Sendo assim, a geração de novos conhecimentos relacionados aos eventos que controlam a migração de células T aos sítios inflamatórios durante a fase crônica da infecção, bem como sua relação com o sistema imunoendócrino, podem levar a novas estratégias clínicas de monitoramento da evolução da Doença de Chagas e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial migratório de células T originadas de pacientes chagásicos crônicos com diferentes formas clínicas de cardiopatia, pela ação de citocinas e hormônios do eixo HPA.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os perfis de citocinas e hormônios do eixo HPA relacionados à inflamação no soro dos pacientes, correlacionando com a gravidade da cardiopatia crônica.
- Avaliar *in locu* a expressão de citocinas classicamente descritas como promotoras de migração celular na inflamação e sua associação com a expressão de fibronectina e o infiltrado inflamatório cardíaco.
- Analisar o potencial migratório de células T sobre fibronectina e citocinas classicamente descritas como moduladoras do tráfego celular (CXCL12 e TNF- α). Em paralelo, avaliar o perfil de ativação de células T após a migração induzida pelos estímulos descritos.
- Avaliar o potencial migratório de células T sob o estímulo prévio de hormônios do eixo HPA (DHEA e Cortisol) e seu perfil de ativação celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes de estudo.

Pacientes chagásicos, em torno de 125 indivíduos (com sorologia positiva para *T. cruzi*, IgM e IgG), com idades entre 33-76 anos, sendo 45 homens e 80 mulheres, oriundos da Província de Santa Fé – Argentina, foram divididos em quatro categorias: 1) sorologia positiva, com Raio-X (RX) e eletrocardiograma (ECG) normais - agrupados como “Indeterminados (IND)”. 2) alterações no ECG (BDASE, BRE, BRD, FA, HVE) e RX normal, agrupados como cardiopatas “Moderados – (MOD)”. 3) alterações no ECG e RX foram agrupados como “Graves - GR”. 4) o grupo controle (CT) é constituído de indivíduos normais (livres de co-morbidades que modificam padrões de resposta imune), pareados por idade aos pacientes chagásicos. Como critérios de exclusão, foram consideradas co-morbidades (co-infecções, alergias, distúrbios hormonais) que possam influir no perfil imunológico dos pacientes. As amostras sanguíneas dos pacientes e indivíduos controle do estudo foram coletadas entre 8-10:00h a.m. para procedimentos experimentais no mesmo dia, e o plasma obtido via centrifugação (400 g, 30 min.) foi separado e conservado à -80°C. Sobre os aspectos legais e éticos, é importante destacar que todos os procedimentos descritos utilizados com o material biológico dos pacientes provenientes de Rosario - Argentina durante este estudo, foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nacional de Rosário (UNR), (Resolução 496/2007 e ampliação 2854/2008), sob responsabilidade do Dr. Juan Beloscar, Dr. Oscar Bottasso e da Dra. Ana Rosa Pérez (Instituto de Imunologia, UNR). A declaração consensual ao estudo e o certificado de aprovação do comitê de ética encontram-se em anexo.

3.2 Perfil endócrino e de citocinas dos pacientes:

A atividade do eixo Hipotálamo-adrenal foi avaliada através da mensuração por ELISA dos níveis circulantes dos hormônios cortisol, ACTH, DHEA e DHEA-sulfato, bem como citocinas CCL-2, IL-4, TGF- β , IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-6 e IL-10 do soro coletado previamente dos pacientes, conforme descrito anteriormente. As

concentrações de citocinas foram determinadas utilizando o KIT comercial de ELISA para as citocinas descritas (Becton Dickinson/Pharmingen, CA, USA). Os limites de detecção utilizados foram IFN- γ : 4.7 pg/ml; IL-6: 0.1 pg/ml; IL-17: 15 pg/ml; IL-10: 7.8 pg/ml; TNF- α : 7.8 pg/ml; CCL-2: 7.8 pg/ml; IL-4: 2 pg/ml; e TGF- β : 7.8 pg/ml. Hormônios plasmáticos foram determinados por imunoensaio de eletroquimioluminescência (RocheDiagnostics, Switzerland) e os limites de detecção utilizados foram Cortisol: 2.5 ng/ml; DHEA-s: 0.1 ng/ml; As análises de creatina quinases no miocárdio (CK-MB) e óxido nítrico foram determinadas por teste colorimétrico comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Todas as amostras foram processadas individualmente com duplicatas e lidas na faixa de 450nm.

3.3. Separação de células mononucleares (PBMCs) de sangue periférico.

Para avaliação de potencial migratório e citofluorimetria, foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico dos indivíduos normais e chagásicos crônicos. Após a retirada do soro/plasma, o material sanguíneo sedimentado é separado por gradiente de centrifugação em solução de Ficoll-Hypaque® (10771, Sigma, USA). O sedimento, em torno de 10ml, é diluído 1:1 em tampão PBS (Phosphate Buffered Saline (P4417, Sigma, USA) à 25°C e acondicionado lentamente sobre o Ficoll, na proporção de 10 ml para cada 20 ml de sangue diluído. O material é centrifugado à 400 g por 20 minutos em temperatura ambiente. A camada de células mononucleares presente na intersecção Ficoll/sangue é retirada lentamente através de pipetagem manual, sendo então o material lavado por duas vezes em PBS/Soro Bovino Fetal a 10% (300 g por 5 minutos cada) Após, o número de células viáveis é determinado em câmara de Neubauer® com auxílio de microscópio óptico e exclusão de células mortas por Azul de Trypan.

3.4 Migração celular em câmaras Transwell®.

Para avaliação do potencial migratório de PBMCs e do efeito de moléculas de matriz extracelular (ECM) como a Fibronectina, citocinas como TNF- α e CXCL12, bem como hormônios como DHEA e Cortisol foram realizados ensaios de

migração *in vitro* utilizando-se câmaras de Transwell® (Costar Corning, USA), onde as células coletadas foram depositadas sobre insertos específicos para cada estímulo descrito acima combinados ou não. As PBMCs retiradas no procedimento 3.3, foram contadas (1×10^6 células por poço) e acondicionadas em câmara de migração vertical *in vitro* Transwell® (Cat. 3421, Corning, USA). Os insertos de cada placa foram tratados previamente com cada estímulo (Fibronectina Humana 10 µg/mL (F2518, Sigma, USA), CXCL12 Humano 200 ng/mL (350-NS-010, R&D Systems, USA) por 1h na estufa à 37°C e TNF-α humano 250 pg/mL (210-TA-100, R&D Systems, USA) combinado ao inserto da Fibronectina por 15 minutos). Após o tratamento, os mesmos insertos foram bloqueados com Albumina sérica bovina (A9418, Sigma, USA) por 45 minutos na estufa. Para avaliação de modulação por hormônios do eixo HPA, como DHEA (D09549, Sigma, USA) e Cortisol (H4001, Sigma, USA), as células foram previamente tratadas por 16h com concentrações específicas de hormônios combinados ou não (10^{-7} , 10^{-8} mg/mL), sendo posteriormente inseridas na câmara como descrito acima sobre estímulo de fibronectina. As células foram então acondicionadas sobre o inserto tratado e a placa foi colocada em incubação na estufa à 37°C por 4h. As células migrantes depositadas na parte inferior do inserto são contadas em câmara de Neubauer® e preparadas para os ensaios de citofluorimetria.

3.5 Citofluorimetria

Para avaliar o perfil de ativação, bem como a expressão de receptores membranares relacionados aos eventos de migração celular, PBMCs migrantes e não migrantes do procedimento 3.4 foram marcadas com anticorpos específicos, adquiridas por um Citômetro de Fluxo e os dados analisados por software específico. As células adquiridas foram centrifugadas (300 g por 5 minutos) e bloqueadas com soro normal humano AB puro (3µL por 15 minutos); foram adicionados então os anticorpos específicos contra moléculas humanas conjugados e seus isotipos controle murinos em cada poço (diluição 1:10, 10µL por 20 minutos), de acordo com a marcação esperada (anti humano CD4 APC Cat. 555349, CD8 PERCPCat. 347314, HLADR FITCCat. 555811, VLA4 PECat. 555503, CD184 APCCat. 555976 ,IgG1 APCCat. 555751, IgG1 PERCPCat. 559425, IgG1 FITCCat. 559532, IgG1 PECat. 554680, Becton & Dickinson, USA). A aquisição das amostras

foi feita utilizando citômetro de fluxo FacsARIA (Becton & Dickinson, USA), sendo a análise realizada com o uso do programa computacional Summit®.

3.6 Análise histológica do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de pacientes chagásicos crônicos e indivíduos controle

Amostras de tecido cardíaco *post mortem* de pacientes chagásicos crônicos e indivíduos controle foram coletadas para análise histológica do infiltrado inflamatório e determinação *in locu* de citocinas e ECM. Para análise de infiltrado, foi realizada coloração por hematoxilina e eosina em cortes parafinados. Na desparafinização e hidratação, os cortes foram incubados por 2 vezes durante 10 minutos em xilol e, posteriormente, levados a 3 recipientes diferentes contendo álcool absoluto durante 2 minutos em cada; logo a seguir, os cortes foram deixados em água corrente durante 1 minuto. Durante a coloração, os cortes foram deixados por 10 minutos em hematoxilina, lavados em água corrente por 1 minuto, e incubados em solução de eosina por 3 minutos. Para analisar a expressão de fibronectina, CXCL12 e TNF- α nos cortes parafinados de tecido cardíaco, as amostras foram desparafinadas e hidratadas na sequência de dois banhos de xilol por 10 min e banhos de álcool absoluto, 95% e 70% e água destilada por 3min cada. Após, dois banhos de PBS por 5 min. cada. O material é imerso em tampão citrato de sódio (10mM, pH 6) e inserido no microondas com potência máxima, fazendo 2-3 ciclos de 5 minutos cada. Repetir o banho de PBS e feito o bloqueio dos receptores Fc com PBS/BSA/Soro de cabra 2% por 1h. Foram então aplicados os anticorpos primários purificados anti FN (DAKO, Cat. A045, 1:50), anti CXCL12 (Santa Cruz, Cat. SC6193, 1:20) e anti TNF- α (Abcam, Cat. ab1793, 1:25) por 16h, e após mais dois banhos de PBS por 5 min., foram aplicados os respectivos anticorpos secundários, diluídos 1:400, como anti coelho Alexa 488 (Invitrogen, Cat A11008), anti cabra alexa 488 (Invitrogen, Cat. A11055) e anti camundongo Alexa 488 (Invitrogen, Cat. A11001) por 45 min. com mais duas lavagens de PBS por 5 min. cada. Após os procedimentos, as lamínulas foram montadas sobre as lâminas com meio de montagem Prolong Anti fade (Invitrogen, Cat. P36966) e analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager A2 esoftware Axiovision Release. A quantificação da média de intensidade de fluorescência foi determinada com software ImageJ, através da análise de cinco campos aleatórios para cada marcação e grupo de estudo.

3.7 Análises estatísticas.

As comparações e as análises de correlação foram efetuadas utilizando-se métodos paramétricos e não paramétricos. As variáveis de categoria foram avaliadas pelo método do qui-quadrado e probabilidade exata de Fisher. Para determinação das análises quantitativas, com comparação entre os grupos de pacientes e o controle, foram utilizados o teste *One Way ANOVA*, com pós teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Um valor de $p < 0.05$ será considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e um desequilíbrio no eixo Hipotálamo-adrenal estão diretamente relacionados à gravidade da cardiopatia nos pacientes chagásicos crônicos.

Para avaliar a expressão de citocinas, bem como sua correlação com a gravidade da cardiopatia chagásica, foram realizados inicialmente experimentos para verificar os níveis circulantes destas moléculas no soro de indivíduos com diferentes graus de comprometimento cardíaco, conforme ilustrado na figura 5.

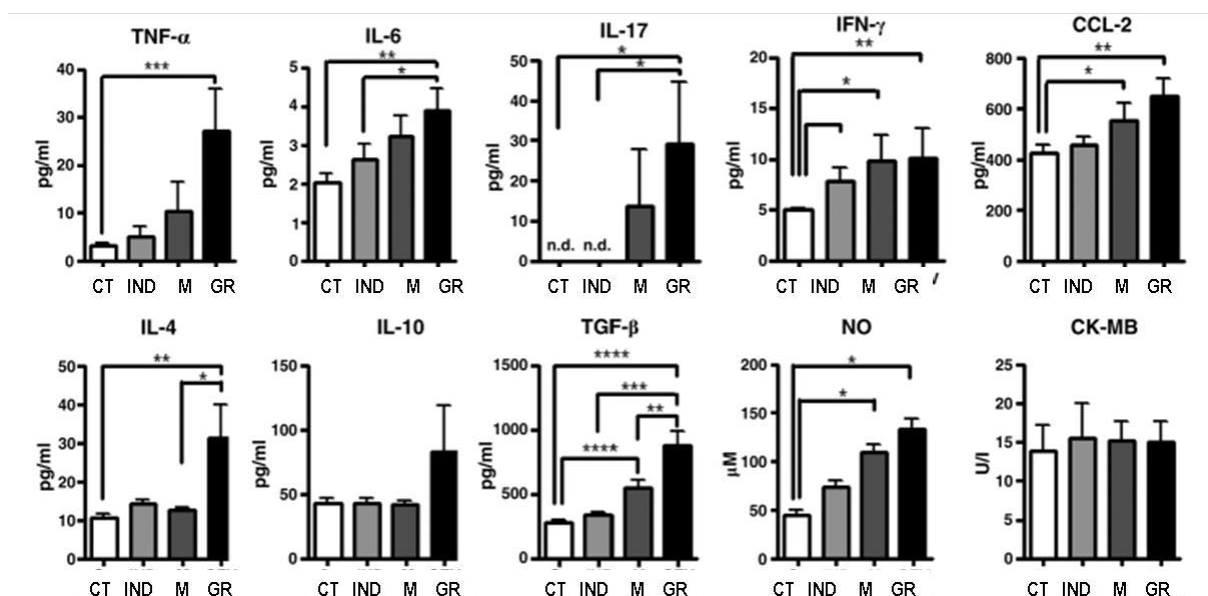


Figura 5. Perfil de citocinas séricas, marcador de lesão e expressão de NO nos grupos de estudo. Citocinas circulantes inflamatórias do soro de pacientes chagásicos estão aumentadas de acordo com diferentes graus de miocardite, bem como expressão de óxido nítrico. O marcador de lesão tecidual CK-MB permanece semelhante entre os grupos. Barras representam erro padrão de cada grupo. CT= indivíduos controle (n=18), IND= indeterminados (n=17), M= moderados (n=13) e GR= graves (n=13). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005. (Pérez AR, Berbert LR, 2011).

Foi observado que, de acordo com a gravidade da doença, há um aumento gradual da expressão de citocinas descritas classicamente como pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-17, IFN- γ , que por sua vez modulam processos imunes relacionados ao recrutamento e ação local de linfócitos nos sítios inflamatórios. Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β) também estão aumentadas nos grupos de pacientes. Cabe ressaltar que o marcador de lesão cardíaca, o CK-MB, se mantém em níveis semelhantes durante o curso da cardite. Visto que há correlação entre expressão de citocinas, comprometimento

cardíaco, bem como o envolvimento de hormônios do eixo HPA, principalmente o cortisol, com essa modulação, procuramos avaliar a expressão de hormônios ligados ao eixo Hipotálamo-adrenal (Fig. 6).

Os hormônios ACTH (adrenocorticotrópico ou corticotropina) e o cortisol, mantiveram níveis séricos semelhantes ao grupo controle, porém, nos níveis de DHEA-s (Dehidroepiandrosterona sulfato) circulantes houve uma queda gradual relacionada à gravidade da doença. Essa queda, por sua vez, aumentou a razão cortisol/DHEA-s, causando um desequilíbrio no eixo Hipotálamo-adrenal, o que pode estar relacionado a eventos imunes na Doença de Chagas.

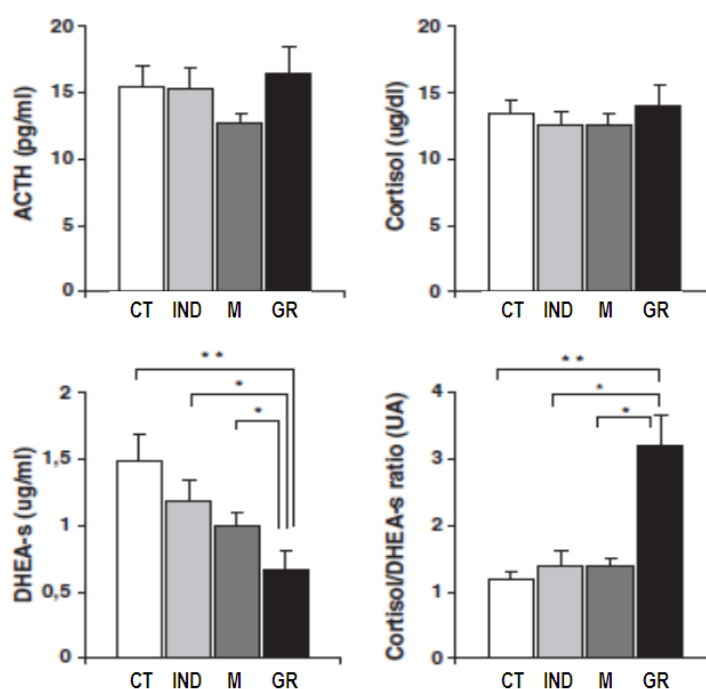


Figura 6. Perfil endócrino sérico nos grupos de estudo. Hormônios relacionados ao eixo HPA (ACTH e Cortisol) em pacientes chagásicos com diferentes graus de cardiopatia se mantêm em níveis semelhantes. A queda nos níveis de DHEA-s promove o aumento da razão cortisol/DHEA-s (UA; unidades arbitrárias). Barras representam erro padrão de cada grupo. CT= indivíduos controle (n=18), IND= indeterminados (n=17), M= moderados (n=13) e GR= graves (n=13). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005. (Pérez AR, Berbert LR, 2011).

4.2 A migração de células Tex vivo é aumentada de acordo com a gravidade da cardiopatia dos pacientes chagásicos, através de diferentes estímulos.

A migração de células T para sítios inflamatórios pode ser modulada por um conjunto de eventos relacionados à expressão de citocinas e ECM, entre outros. Para determinar a expressão *in locu* de citocinas e ECM classicamente descritas

como auxiliares no processo de tráfego celular, foi realizada análise do tecido cardíaco de indivíduos controle e pacientes do grupo de estudo. Durante análise histológica de tecido cardíaco de pacientes chagásicos, foi observado intenso infiltrado inflamatório, bem como aumento de expressão FN, CXCL12 e TNF- α (Fig 7) comparados aos indivíduos controle, demonstrando que *in locu*, o complexo formado por estas moléculas pode influenciar o tráfego de células no tecido inflamado. Sendo assim, para corroborar com o resultado obtido na análise tecidual, avaliamos a resposta migratória *ex vivo* de células T oriundos de pacientes com diferentes graus de comprometimento cardíaco, sob os diferentes estímulos, fibronectina, CXCL12 e TNF- α , combinados ou não (Fig. 8).

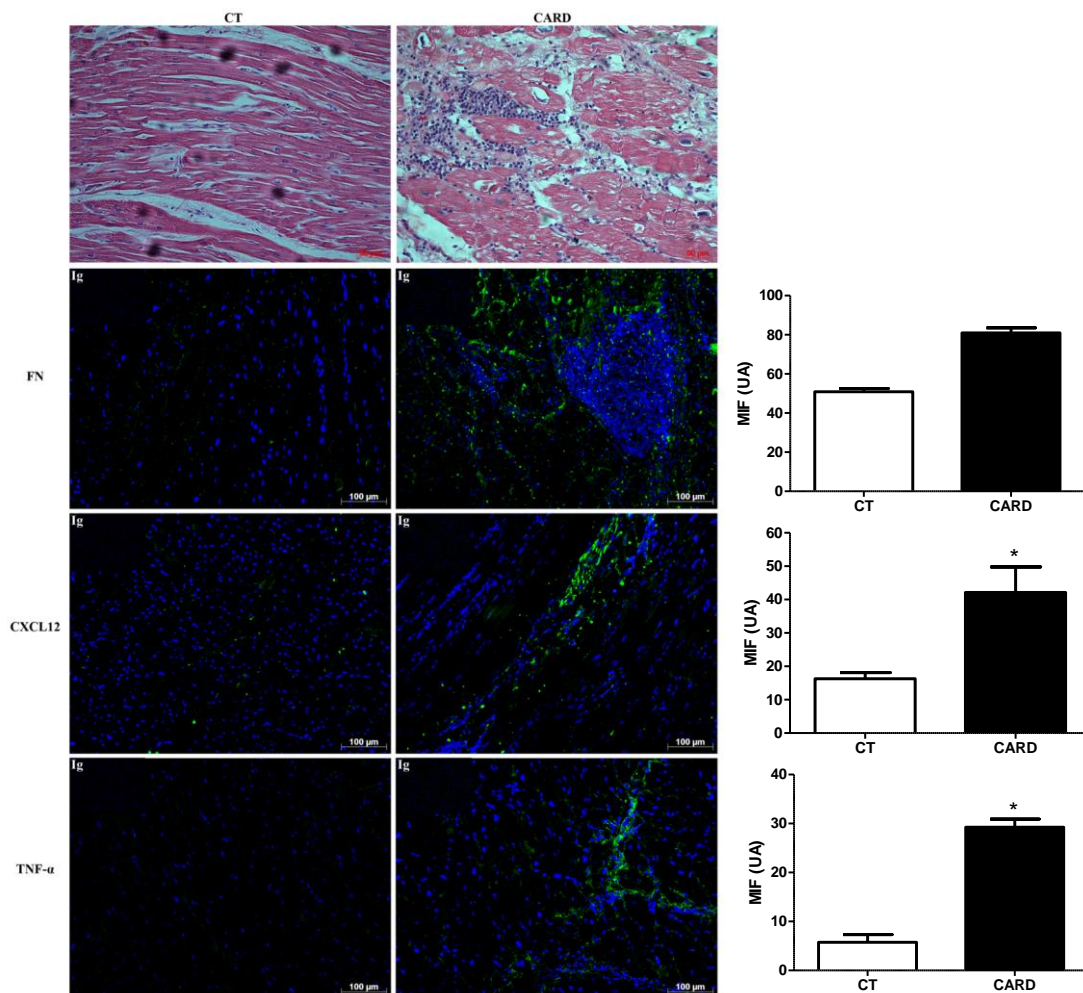


Figura 7. Análise histológica e imunofluorescência do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco dos grupos de estudo. A expressão de citocinas quimiotáticas em tecido cardíaco humano de pacientes crônicos e indivíduos controle demonstra *in locu*, que estas moléculas estão localizadas ao infiltrado inflamatório característico da fase crônica da infecção, podendo estar associadas ao influxo de células ao tecido. Imagens representativas de uma amostra por grupo. CT = controle, CARD = cardíacos (Moderados e Graves), HE = hematoxilina e eosina, FN = fibronectina. Aumento de 20X. Análise de Média de Intensidade de Fluorescência obtida na mensuração de 5 imagens por grupo de estudo (CT, n=1 e CARD, n=2). FN, TNF e CXCL12 marcados em verde, núcleos celulares em azul.

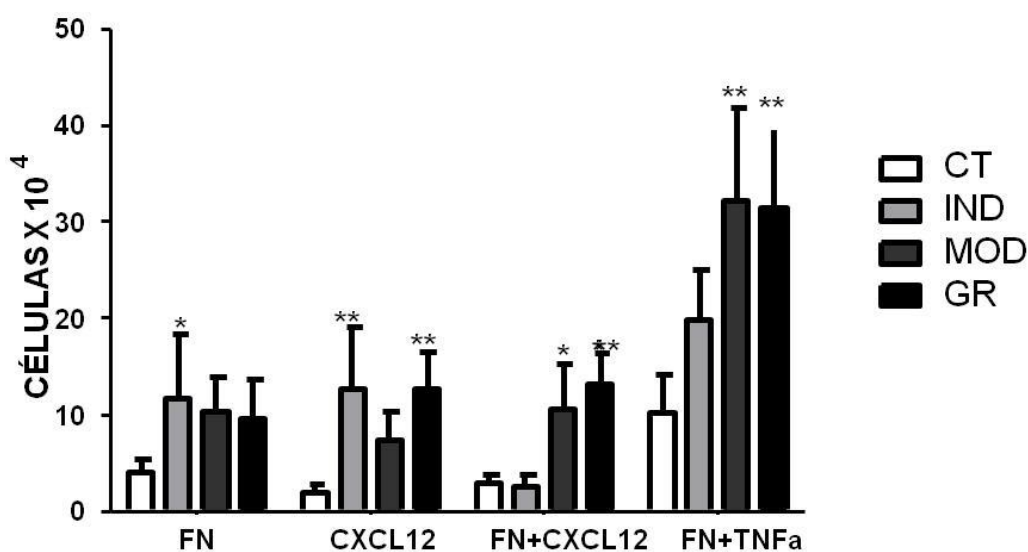


Figura 8. Análise do potencial migratório de PBMCs sobre estímulos quimiotáticos. Migração linfocitária por Transwell® sobre diferentes estímulos demonstra que o potencial migratório está associado à condição clínica dos pacientes e o estímulo específico. Células T foram submetidas à migração *ex vivo* mediante estímulo (FN – Fibronectina, CXCL12 e TNF- α , combinados ou não). Dados representativos de 4 experimentos com duplicatas, onde foram obtidos pools de células para cada ensaio (CT, n=3; IND, n=3; MOD, n=3, GR, n=3). Valores finais após subtração dos valores iniciais pelos de BSA (controle não quimiotático) e 5×10^5 células iniciais de cada grupo por poço. CT= indivíduos controle, IND= indeterminados, MOD= moderados e GR= graves. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; Valores de p analisados em comparação com grupo controle, para cada estímulo.

Foi observado que o estímulo dessas moléculas aumenta a resposta migratória de células T de maneira individual nos pacientes, principalmente os com maior gravidade cardíaca. Em relação às moléculas combinadas como fibronectina e CXCL12, e principalmente fibronectina e TNF- α (o TNF- α sozinho não estimula migração), há um aumento ainda maior desta resposta migratória, corroborando a hipótese das interações moleculares no estímulo à migração linfocitária.

A partir da obtenção das amostras celulares (PBMCs), antes e depois dos ensaios funcionais para cada estímulo, foi determinada a região de análise, por citofluorimetria, a partir da qual a correlação entre os grupos foi avaliada (Fig. 9). Sendo a expressão de um dos receptores de fibronectina (integrina VLA4) e do receptor da quimiocina CXCL12 (CXCR4), fatores muito importantes no fluxo da migração celular, avaliamos também a expressão destas moléculas nas populações de células Totais, dentro dos grupos de estudo (Fig. 10) antes dos ensaios de migração, porém, nenhuma diferença significativa foi encontrada, tendo as células provenientes de todos os grupos fenótipo semelhante para que seja induzido o sinal de adesão / migração a depender do estímulo.

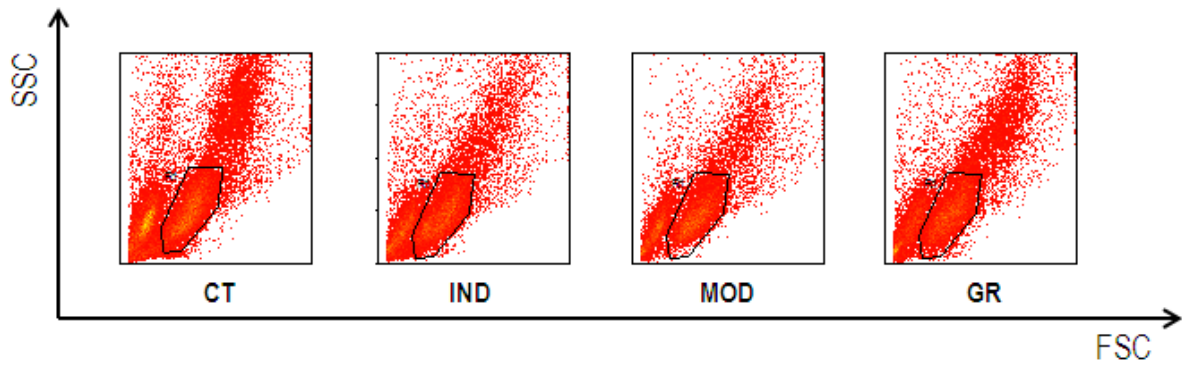


Figura 9. Imagens representativas de tamanho e granulosidade de PBMCs obtidas dos indivíduos controle e grupos de pacientes chagásicos crônicos. As análises de correlação, expressão de marcadores e comparação entre grupos foram realizadas a partir da região selecionada previamente nos gráficos, determinada pelo tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) de células T. Imagens representativas de uma amostra por grupo analisadas no software Summit® após aquisição no citômetro de fluxo. CT= indivíduos controle, IND= indeterminados, MOD= moderados e GR=graves.

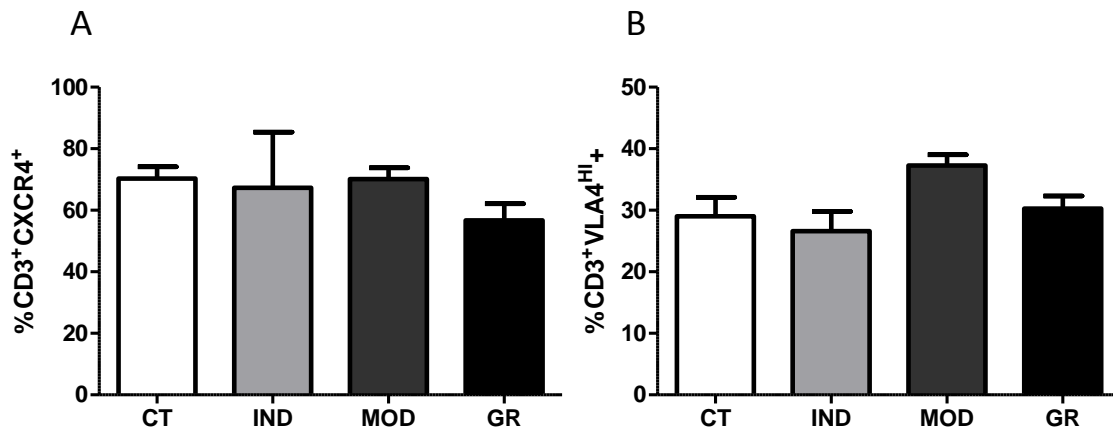


Figura 10. Perfil de expressão de CXCR4 e VLA4^{high} em células T totais. O percentual de células T CD3⁺CXCR4⁺ (A) e CD3⁺VLA4^{high+} (B) demonstra alta expressão dos receptores para CXCL12 e fibronectina neste grupo celular. CT= indivíduos controle, IND= indeterminados, MOD= moderados e GR=graves.*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; Valores de p analisados em comparação com grupo controle.

4.3 As populações de células T ativadas podem ser moduladas de acordo com o estímulo de migração e gravidade da cardiopatia nos pacientes.

Para avaliar o fenótipo de ativação das células T migrantes e correlacionar essa expressão com o percentual de influxo nos ensaios de migração *ex vivo*, foi analisada a expressão do marcador HLADR⁺VLA4⁺ nas células T antes e após migração, nos diferentes grupos. Como demonstrado na figura 11, na avaliação do número de células T dentro das PBMCs obtidas, não houve diferenças significativas entre o percentual de células TCD4 e CD8 entre os grupos. Já na análise de

moléculas definidas como marcador de ativação antes da migração, há uma tendência biológica de aumento gradual do percentual destas células dentro da população de células TCD4 entre os pacientes em relação aos controles e, na população de linfócitos CD8 a diferença no percentual das células HLADR⁺VLA4⁺ em relação ao controle, é bastante significativa, corroborando o fato de que as células destes grupos já estariam previamente sensibilizadas pela infecção crônica.

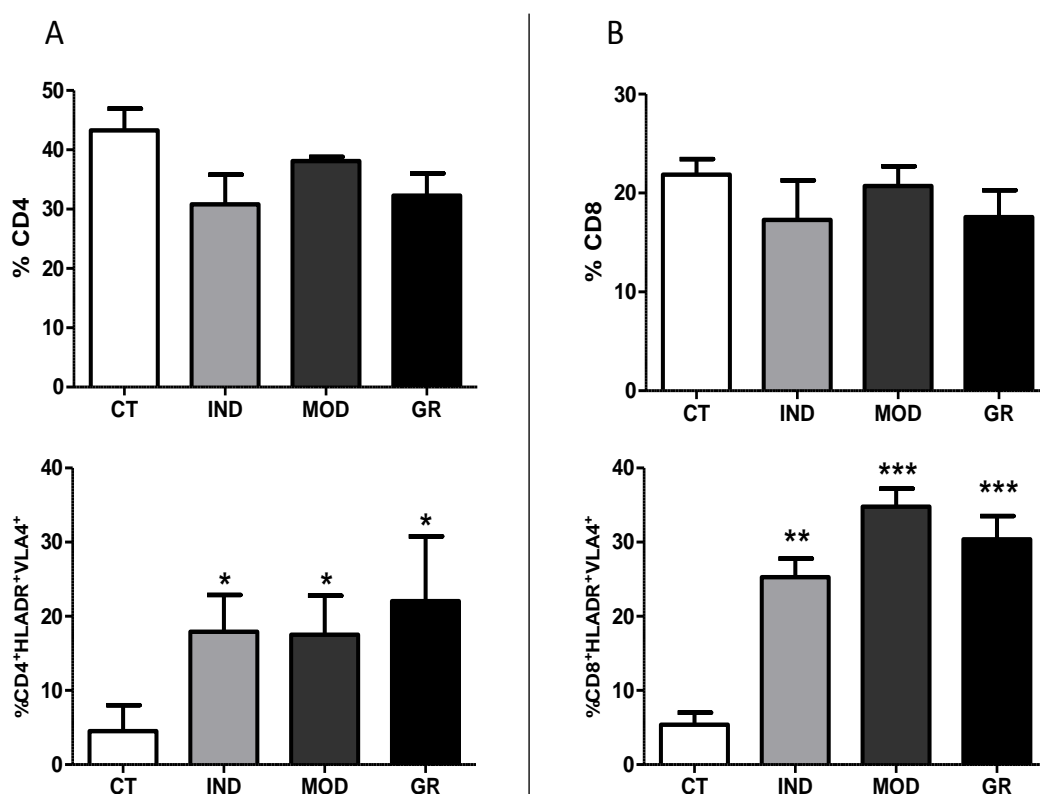


Figura 11. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 antes da migração *ex vivo*. Percentual de células CD4 (A) e CD8 (B), bem como % de células T HLADR⁺VLA4⁺ dentro de cada subpopulação demonstra aumento destes grupos celulares de acordo com a gravidade dos grupos de estudo. CT= indivíduos controle, IND= indeterminados, MOD= moderados e GR= graves.*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; Valores de p analisados em comparação com grupo controle.

A partir da obtenção de células migrantes após os ensaios funcionais, sob o efeito de cada estímulo pré-determinado na figura 8, analisamos o percentual de *INPUT* das populações de células TCD4 e CD8, e também das células destas subpopulações que expressam o fenótipo de ativação HLADR⁺VLA4⁺. Foi observado que o estímulo da fibronectina (Fig. 12), não induz diferenças entre os percentuais de *INPUT* das subpopulações de células TCD4 e CD8, porém há um pequeno aumento de células CD4 ativadas dentro dos grupos de pacientes em relação ao grupo controle, e uma diferença significativa de células CD8 ativadas dentro dos grupos cardíacos (moderados e graves) em relação ao controle, corroborando dados

anteriores que demonstram a importância das células T CD8 na progressão da cardiopatia chagásica. Já nas células estimuladas pela quimiocina CXCL12 (Fig. 13), evento semelhante entre as subpopulações se mantém, demonstrando também a tendência de aumento de percentual de células T CD4 e CD8 ativadas dentre os grupos de pacientes.

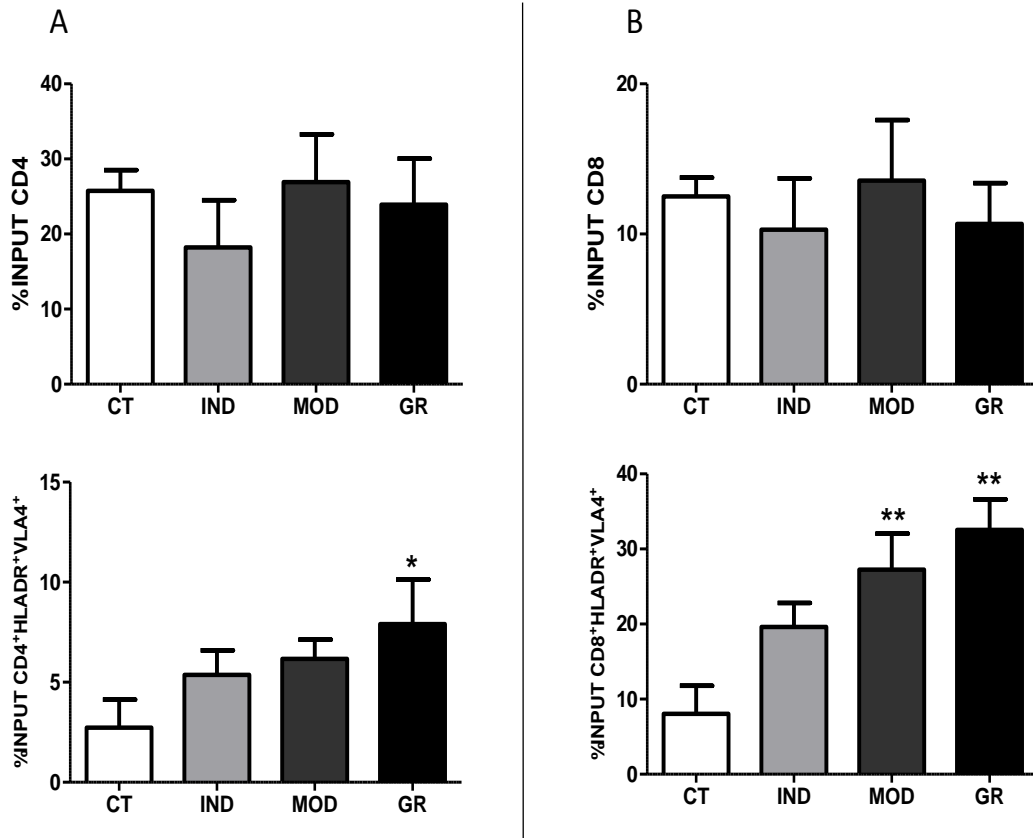


Figura 12. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 após migração *ex vivo* com estímulo de fibronectina. Percentual de *INPUT* de células CD4 (A) e CD8 (B), bem como % de *INPUT* de células T HLADR⁺VLA4⁺ dentro de cada subpopulação após migração com estímulo de FN (fibronectina) demonstram que há modulação das subpopulações de células T ativadas de acordo com os grupos de estudo. CT= indivíduos controle, IND= indeterminados, MOD= moderados e GR= graves. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; Valores de p analisados em comparação com grupo controle.

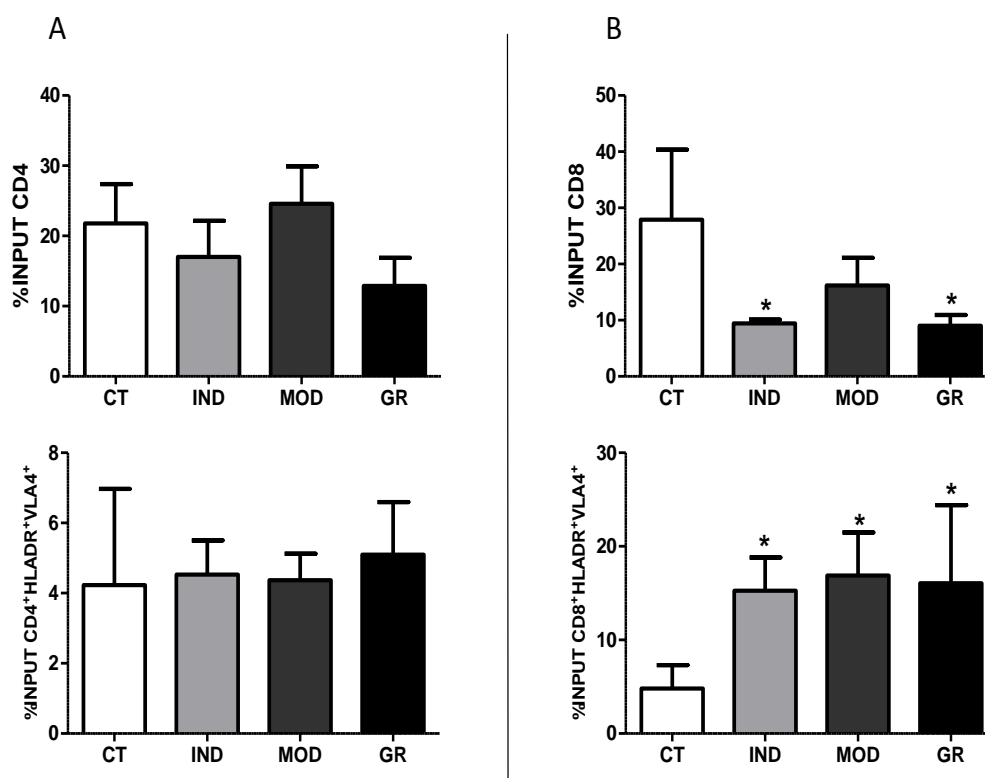


Figura 13. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 após migração *ex vivo* com estímulo de CXCL12. Percentual de *INPUT* de células CD4 (A) e CD8 (B), bem como % de *INPUT* de células T HLADR⁺VLA4⁺ dentro de cada subpopulação após migração com estímulo de CXCL12 demonstram que há modulação das subpopulações de células T ativadas de acordo com os grupos de estudo CT= indivíduos controle, IND= indeterminados, MOD= moderados e GR= graves.*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; Valores de p analisados em comparação com grupo controle.

No estímulo combinado entre a fibronectina e CXCL12 (Fig. 14), seria esperado um aumento tanto no potencial migratório quanto nas diferenças percentuais entre as subpopulações e seus perfis fenotípicos de ativação, porém, assim como nos estímulos em separado, somente foi observada um pequeno aumento nos percentuais de *INPUT* entre as subpopulações e seu fenótipo de ativação, sendo interessante observar que nesse estímulo combinado, o influxo de células T CD4 é pouco maior no grupo de pacientes graves em relação aos controles, mas em números menores que das células T CD8.

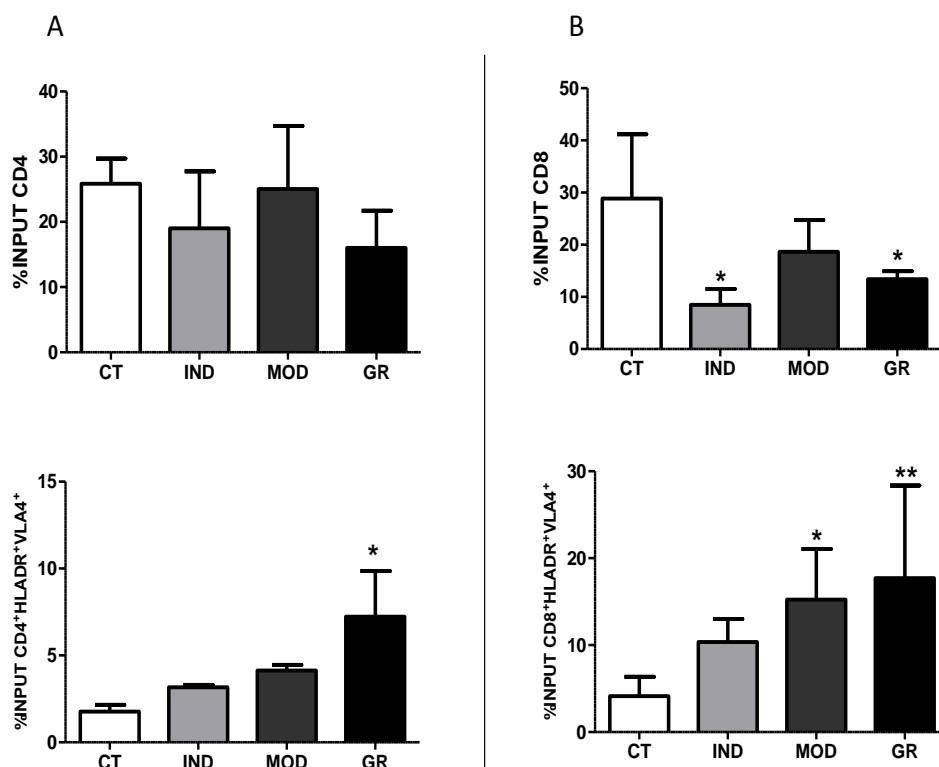


Figura 14. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 após migração *ex vivo* com estímulo de fibronectina e CXCL12. Percentual de *INPUT* de células CD4 (A) e CD8 (B), bem como % de *INPUT* de células T HLADR⁺VLA4⁺ dentro de cada subpopulação após migração com estímulo de FN (fibronectina) combinado com CXCL12 demonstram que há pouca modulação das subpopulações de células T ativadas de acordo com os grupos de estudo. CT= indivíduos controle, IND= indeterminados, MOD= moderados e GR= graves. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; Valores de p analisados em comparação com grupo controle.

Classicamente, a citocina TNF- α por si só não estimula a migração, porém, quando associada a outras moléculas, e no contexto da migração celular, à fibronectina, pode gerar um aumento significativo tanto no potencial de migração de PBMCs quanto influenciar no percentual de influxo de linfócitos ativados (Fig. 15). Células T CD8 ativadas, como descrito nos resultados anteriores, tendem a migrar em maior porcentagem em relação às células T CD4 ativadas, gerando uma diferença significativa entre o grupo cardíaco, formado por moderados e graves, e o grupo controle, determinando assim que essa associação de moléculas é importante na migração funcional dos linfócitos bem como na sua ativação.

Todos os estímulos descritos neste conjunto de resultados são importantes indutores do trânsito de células aos sítios inflamatórios, porém, sistemicamente há outros estímulos, principalmente hormonais, que poderiam modular os eventos de migração agindo sobre células do sistema imune, como cortisol e DHEA, conforme descrito a seguir.

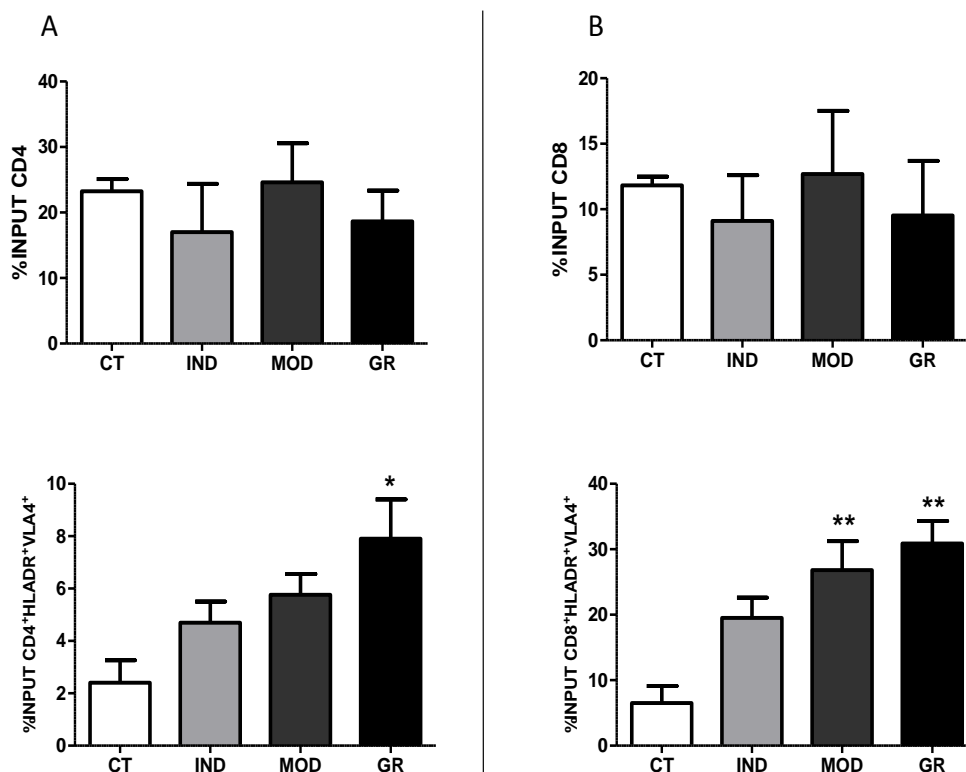


Figura 15. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 após migração *ex vivo* com estímulo de fibronectina e TNF- α . Percentual de *INPUT* de células CD4 (A) e CD8 (B), bem como % de *INPUT* de células T HLADR⁺VLA4⁺ dentro de cada subpopulação após migração com estímulo de FN (fibronectina) combinado com TNF- α demonstram que há modulação das subpopulações de células T ativadas de acordo com os grupos de estudo. CT= indivíduos controle, IND= indeterminados, MOD= moderados e GR= graves. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; Valores de p analisados em comparação com grupo controle.

4.4 Hormônios relacionados ao eixo HPA podem modular a migração de PBMCs de indivíduos controle e cardíacos de acordo com suas concentrações.

Considerando também uma possível modulação de hormônios do eixo Hipotálamo-adrenal (DHEA e cortisol) sobre os eventos migratórios, foi também avaliado o potencial de migração das células T dos indivíduos controle e cardíacos (moderados e graves), tratados previamente com DHEA e cortisol, sobre fibronectina (Fig. 16), baseado no desequilíbrio resultante destes dois hormônios durante a fase crônica da Doença de Chagas, como demonstrado na figura 6. Observamos que a migração linfocitária *ex vivo* pode ser modulada por estímulos hormonais, em diferentes concentrações, tanto em indivíduos controle, como nos cardíacos. Foi observado um aumento do potencial migratório das PBMCs de indivíduos controle após o tratamento hormonal, principalmente quando há

diminuição da concentração de DHEA, bem como com a combinação entre o mesmo e o Cortisol, corroborando com o fator biológico do aumento da razão entre cortisol e DHEA em pacientes cardíacos que poderia incrementar o potencial migratório destas células ao sítio inflamatório. Também interessante, dentro do grupo cardíaco, é que foi observado um aumento significativo desse potencial migratório com tratamento hormonal, mesmo estas células já sendo previamente sensibilizadas pelas concentrações fisiológicas sistêmicas destes hormônios durante a infecção crônica destes pacientes, o que demonstra que os linfócitos poderiam ser reativados / sensibilizados em uma nova apresentação a esses hormônios *in vitro*.

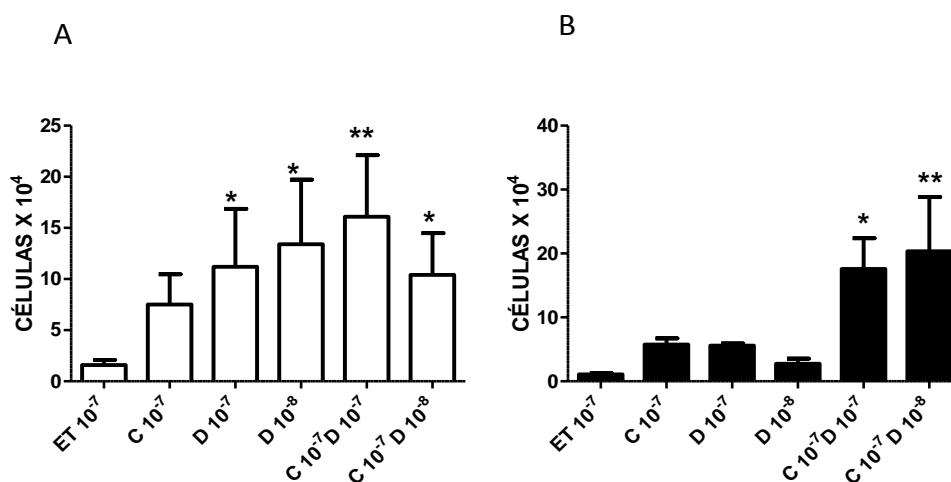


Figura 16. Análise do potencial migratório de PBMCs após pre tratamento com hormônios relacionados ao eixo HPA. Pools de PBMCs de cada grupo (n = 3-4 amostras / grupo) foram submetidos à migração *ex vivo* mediante estímulo de fibronectina pós-tratamento hormonal por 16h em cultura com DHEA e cortisol, demonstrando que há modulação da migração pelo contato das células T com os hormônios em cultura prévia. Dados representativos de um experimento com três diferentes amostras (*pools*) de indivíduos controle (CT) em A e pacientes cardíacos (CARD – moderados e graves) em B. Pre tratamento com diluente Etanol (ET) como controle, Cortisol (C) e DHEA (D), em suas respectivas concentrações (mg/ml). 5x10⁵ células iniciais de cada grupo por poço. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; Valores de p analisados em comparação com grupo controle em etanol, para cada estímulo / concentração.

Para avaliar o percentual de *INPUT* das subpopulações de células TCD4 e CD8 e se sua ativação poderia ser afetada pelo tratamento hormonal, a expressão destes marcadores foi analisada após os ensaios funcionais de modulação imunoendócrina.

Após o tratamento hormonal em diferentes concentrações associado ao estímulo de fibronectina, não há diferenças no *INPUT* de células CD4 e CD8 (Fig. 17), porém, um detalhe interessante é que neste aspecto, a subpopulação de células CD4 tende a migrar mais, quando comparada ao grupo CD8. Porém, com o pré-tratamento hormonal, houve uma purificação destas subpopulações, já que as

PBMCs acondicionadas em cultura tendem a se separar em populações mielóides, mais aderentes, das linfóides, proporcionando uma maior porcentagem de linfócitos para a realização do experimento. Em relação ao *INPUT* de células ativadas destes grupos, há diferença entre as células do grupo cardíaco e o controle, principalmente quando comparada a subpopulação CD8, demonstrando uma possível correlação entre a combinação e a concentração dos hormônios do eixo HPA, a associação com a fibronectina e o influxo de células T CD8 reativas ao sítio inflamatório.

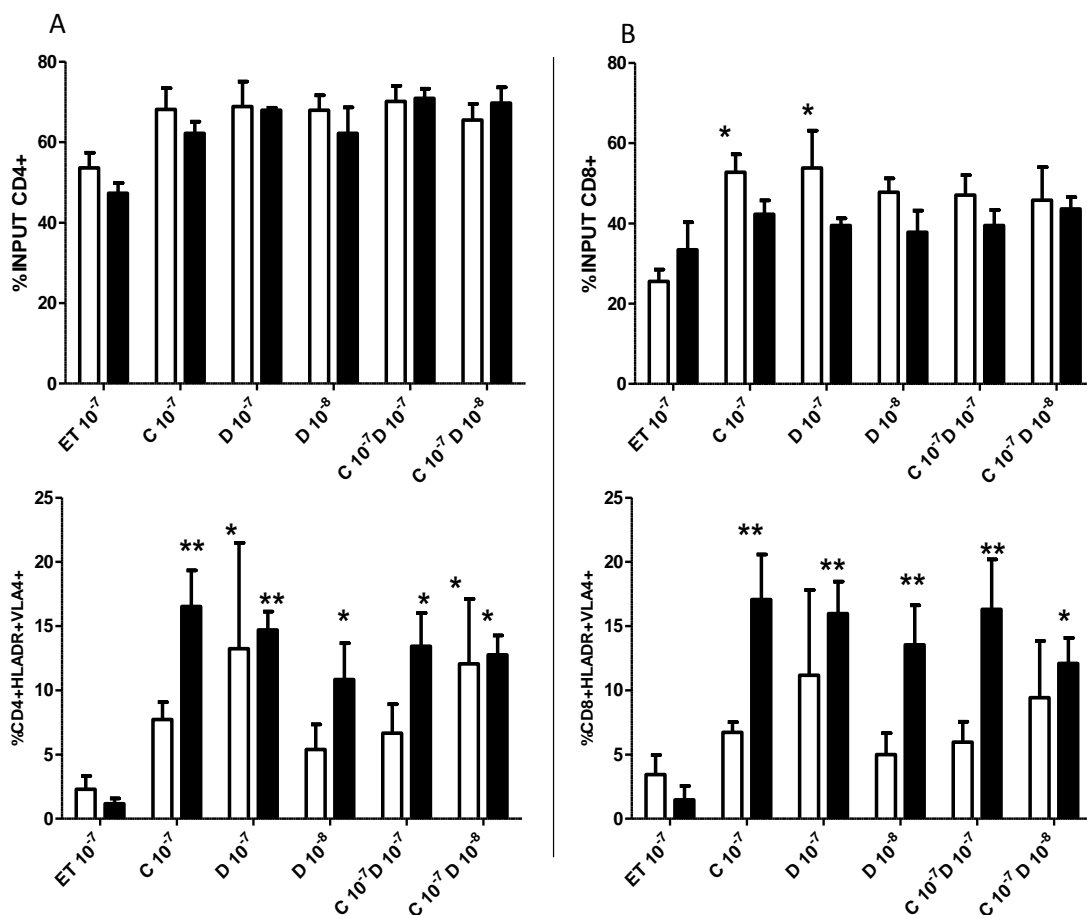


Figura 17. Perfis populacionais de células T CD4 e CD8 após migração *ex vivo* e pré tratamento de hormônios do eixo HPA. Percentual de *INPUT* de células CD4 (A) e CD8 (B), bem como % de *INPUT* de células T HLADR⁺VLA4⁺ dentro de cada subpopulação após migração com estímulo de FN (fibronectina) após pré tratamento com hormônios. Etanol (ET) como controle, Cortisol (C) e DHEA (D), em suas respectivas concentrações. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005; Valores de p analisados em comparação com grupo controle em etanol, para cada estímulo / concentração. Barras claras = indivíduos controle (CT), e barras escuras = pacientes cardíacos moderados e graves (GR).

Em conjunto, os dados referentes ao estímulo combinado de moléculas de matriz extracelular, citocinas e hormônios e o aumento do potencial migratório de células T durante a infecção chagásica crônica, demonstram que a associação entre estas moléculas pode promover uma possível rota na evolução da cardiopatia chagásica, a partir do influxo de células T.

5 DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste trabalho demonstram uma intensa relação entre expressão de citocinas/quimiocinas, desequilíbrio hormonal no eixo Hipotálamo-adrenal e evolução da gravidade da cardiopatia na Doença de Chagas Humana. Trabalhos prévios do nosso grupo (Corrêa-de-Santana et al., 2006; Smaniotto et al., 2010), bem como do grupo de colaboração deste projeto (Pérez et al., 2011 e 2012; Roggero et al., 2012) já demonstraram que, em modelo murino, há uma modulação sistêmica destes eventos envolvendo hormônios, quimiocinas/citocinas e moléculas de matriz extracelular, o que corrobora os dados aqui apresentados, e relativos a pacientes chagásicos.

No primeiro conjunto de dados apresentados e já publicados deste trabalho (Pérez et al., 2011), foi demonstrada uma intensa correlação entre a expressão de citocinas relacionadas à respostas inflamatórias (TNF, IFN, IL-6, IL-17) e a gravidade da cardiopatia nos grupos de pacientes. Estas citocinas, por sua vez modulam processos imunes relacionados ao recrutamento e ação local de linfócitos nos sítios inflamatórios, conforme descrito em trabalhos do nosso e outros grupos, principalmente em modelo murino na fase aguda da doença. Por outro lado, houve aumento paralelo na produção de IL-10 e IL-4 no curso da cardite crônica, que não demonstrou ser suficiente para uma polarização de perfis Th1 para Th2. Cabe ressaltar que o marcador de lesão cardíaca, o CK-MB, se manteve em níveis semelhantes durante o curso da cardite, mesmo que através dos exames clínicos de Raios X e Eletrocardiograma tenham sido apresentadas disfunções no funcionamento cardíaco. Evento semelhante foi descrito por Okamoto (2014), onde foram avaliados diversos biomarcadores de comprometimento cardíaco em infecção chagásica, e CK-MB também manteve níveis semelhantes entre os grupos cardíacos.

Para correlacionar a produção de citocinas, a gravidade cardíaca e a modulação do processo por hormônios do eixo HPA, foram analisados os níveis destas moléculas no soro dos diferentes grupos de pacientes bem como nos indivíduos controle. Foi observado que os hormônios ACTH e o cortisol, mantiveram níveis séricos semelhantes ao grupo controle, porém, nos níveis de DHEA-s circulantes houve uma diminuição gradual relacionada à gravidade da doença. Essa diminuição, por sua vez, aumentou a razão cortisol/DHEA-s, causando um

desequilíbrio no eixo Hipotálamo-adrenal, o que pode estar relacionado a eventos imunes na Doença de Chagas. A ativação do eixo HPA, somada à expressão de cortisol, normalmente induz à produção de DHEA e DHEA-s, que estão envolvidos em mecanismos imunomodulatórios, por exemplo, na diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-6 e IFN- γ (Yen et al., 2001; Knoferl et al., 2003; Straub et al., 2002), bem como, em paralelo com o cortisol, induzir efeitos deletérios no organismo conforme previamente descrito, porém, esses mecanismos ainda não estão bem elucidados (Hazeldine et al., 2010). Nosso grupo demonstrou em 2011 a primeira correlação entre razão cortisol / DHEA-s e o comprometimento cardíaco na Doença de Chagas, e o mesmo evento está envolvido em outras infecções como tuberculose e AIDS (Bozza et al., 2007; Chittiprol et al., 2009). Interessante ressaltar que apesar dos níveis séricos de cortisol serem altos, porém semelhantes entre os grupos, não pareceu haver correlação com a alta expressão de citocinas pró inflamatórias. Alterações no eixo HPA já foram demonstradas durante a fase aguda da infecção em camundongos (Corrêa-de-Santana et al., 2006), principalmente no contexto da alta liberação de glicocorticoides, cujo bloqueio na fase aguda promoveu um intenso processo inflamatório, aumentando a letalidade no modelo (Roggero et al., 2006; Pérez et al., 2007). Correlacionando com a expressão de citocinas observada no resultado anterior, a diminuição da produção de DHEA-s nos pacientes cardíacos está diretamente relacionada ao aumento de TNF- α , já que seu bloqueio durante o tratamento em doenças autoimunes resultou na alta da produção do hormônio DHEA-s (Ernestam et al., 2007). A alta produção de citocinas pró-inflamatórias, por sua vez, poderia restringir alguns eventos do eixo HPA, bloqueando os efeitos estimulatórios do ACTH sobre as glândulas pituitária e adrenais (Vankelecom et al., 1990; Gaillard et al., 1990; Jaattela et al., 1991). Sendo assim, a diminuição relativa da ação anti-inflamatória do cortisol poderia estar relacionada com o desequilíbrio nos processos inflamatórios envolvidos em danos ao miocárdio e modulação de um perfil Th1 e Th17 durante a fase crônica da doença em pacientes.

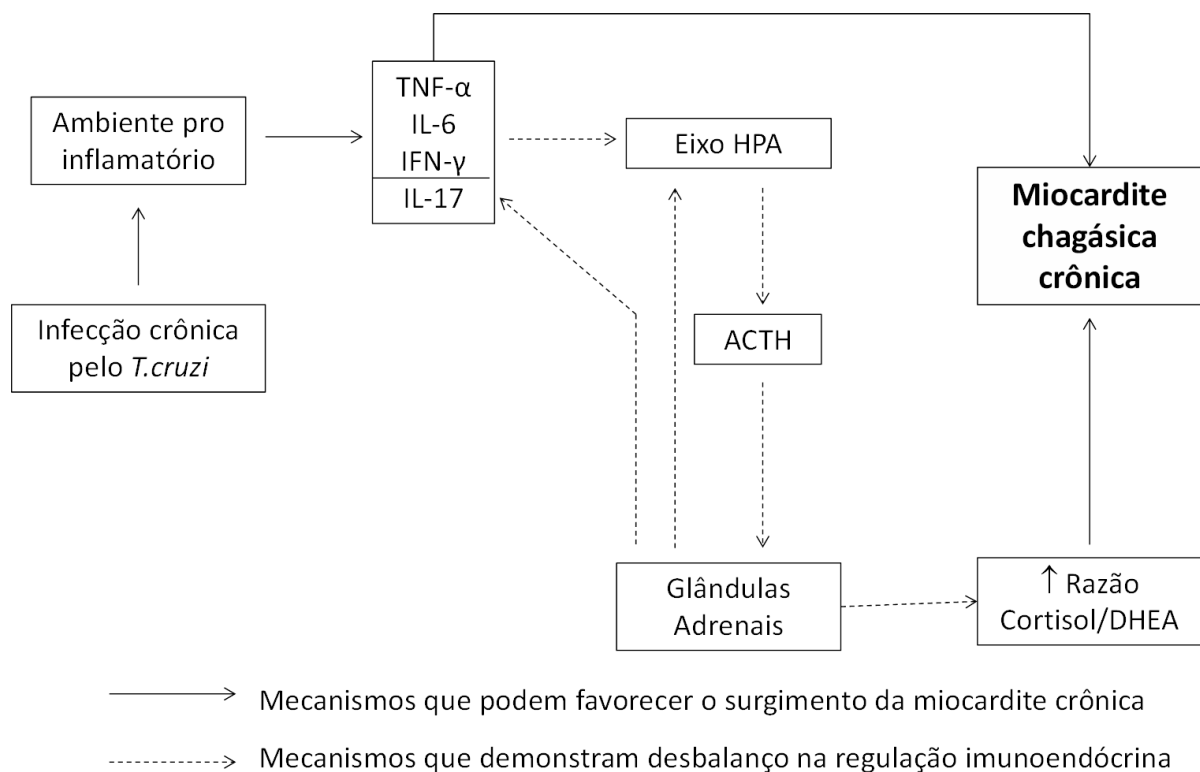


Figura 18. Mecanismos que sugerem uma regulação neuroimunoendócrina anormal em pacientes chagásicos crônicos. Altos níveis circulantes de citocinas pro-inflamatórias derivadas da infecção associadas ao desbalanço na produção de hormônios do eixo HPA (↑Cortisol/DHEA) podem favorecer a gênese da miocardite crônica (Adaptado e modificado a partir de Pérez AR, Berbert LR, 2011).

Determinadas as primeiras análises de perfil inflamatório e endócrino nos grupos de estudo, e procurando correlacionar estes perfis e a migração celular ao miocárdio e à progressão da gravidade nos modelos, foi avaliado o potencial migratório de linfócitos sobre estímulos classicamente descritos no fluxo de células e uma possível modulação imunoendócrina sobre o processo. Primeiramente, conforme observado nos resultados de migração *ex vivo*, a presença de estímulos quimiotáticos como fibronectina e CXCL12, combinados ou não, já aumentam a resposta migratória de linfócitos de pacientes chagásicos, e o mesmo efeito foi demonstrado em modelo murino, na migração de timócitos, demonstrando o complexo molecular que modula a migração (Savino et al., 2002; Savino et al., 2004; Cotta de Almeida et al., 2003; Mendes da Cruz et al., 2006). Esses dados também estão relacionados com a expressão dessas moléculas no tecido cardíaco, *in locu*, de pacientes chagásicos, e da expressão de CXCR4 e VLA4, receptores de fibronectina e CXCL12, observada nos linfócitos dos diferentes grupos, demonstrando que estas células já apresentam um fenótipo prévio que possibilita o aumento do seu potencial migratório, correlacionado com a expressão das moléculas alvo no tecido. Cabe ressaltar que outras moléculas de matriz extracelular

associadas à fibronectina, como a laminina, podem estar participando destes eventos, tanto por ser uma proteína que também é altamente expressa durante a infecção causando fibrose e remodelamento de ECM no tecido cardíaco (Magalhães-Santos et al., 2002; Garzoni et al., 2008; Calvet et al., 2009), facilitando a interação do parasita na célula (Mattos et al., 2012; Nde et al., 2012), quanto participando do fluxo de linfócitos durante processos autoimunes em modelo murino infectado (Silva-Barbosa et al., 2000). A combinação da fibronectina com TNF- α , que por sua vez é altamente expresso nos pacientes cardiopatas (Pérez et al., 2011; Pissetti et al., 2011; Rocha-Rodrigues et al., 2012; Dutra et al., 2014), induz a um aumento ainda maior na resposta migratória destes linfócitos, demonstrando mais uma vez a intensa relação entre a expressão de citocinas e outras moléculas muito presentes nos eventos de migração celular em infecções, e proteínas de ECM como a fibronectina, principalmente na Doença de Chagas humana, conforme demonstrado nos resultados iniciais deste trabalho.

O influxo de subpopulações de células T CD4 e CD8 é um delineador de evolução da fisiopatologia desta infecção, porém, em pacientes crônicos, a proliferação de linfócitos é menor, comparada aos pacientes agudos e indivíduos controle em resposta a moléculas do parasita, bem como sua capacidade de ativação (Giraldo et al., 2013; Longhi et al., 2014), e, também nesse contexto, linfócitos B produtores de IL-10 estariam participando dos processos imunoregulatórios com outros linfócitos (Fares, 2013). A molécula co estimulatória HLA-DR tem sido descrita como marcadora de ativação de células T humanas e está associada aos fenótipos descritos em pacientes chagásicos para células efetoras (Giraldo et al., 2011) e reguladoras (Araújo et al., 2007). Além disso, esta molécula está associada ao background genético que pode conferir resistência à infecção chagásica em pacientes (Faé et al., 2000; Nieto et al., 2000; Del Puerto et al., 2012 e 2013). No mesmo contexto, a expressão da integrina VLA-4 em linfócitos foi descrita como marcador de evolução clínica em pacientes com miopatia, como Distrofia Muscular de Duchenne (Pinto Mariz et al., 2010; Barthélémy et al., 2014). Estas duas moléculas associadas, e sua expressão em linfócitos, tendem a ser um marcador clássico de ativação e evolução clínica em pacientes chagásicos que por sua vez potencializam a migração e ação efetora dos linfócitos no sítio inflamatório.

As PBMCs circulantes derivadas dos diferentes grupos deste estudo possuem subpopulações semelhantes de células T CD4 e 8, e, no percentual de células T ativadas (HLADR⁺VLA4⁺), houve diferenças entre os grupos de pacientes em

relação aos indivíduos controle, corroborando com dados deste trabalho com outros grupos que demonstraram que células T ativadas estão presentes em pacientes, mesmo com a resposta proliferativa reduzida (Piedras et al., 1997; Giraldo et al., 2013; Longhi et al., 2014). Após análise do potencial migratório sobre diferentes estímulos quimiotáticos, foram observadas modulações nos percentuais de *INPUT* de células T CD4 e 8. O estímulo da proteína fibronectina, além de promover o influxo de células nos ensaios *in vitro* (por ser altamente expressa no tecido cardíaco mediante infecção chagásica) pode também estimular a expressão da integrina VLA4, e, como observado nos resultados deste trabalho, houve uma tendência do aumento do marcador de ativação HLADR⁺VLA4⁺ na subpopulação de linfócitos CD4, mas com diferenças significativas de células T CD8 entre os grupos de pacientes em relação aos controles, demonstrando uma possível correlação entre a expressão de um importante fator potencializador de migração e adesão celular (FN) com o tráfego de uma subpopulação linfocitária (CD8) que por sua vez é relacionada aos danos teciduais durante o processo inflamatório. Já na migração *ex vivo* de células estimuladas pela quimiocina CXCL12, que também é altamente expressa em sítios inflamatórios, a frequência populacional se mantém semelhante entre as subpopulações, demonstrando também o aumento de percentual de células T CD4 e CD8 ativadas dentre os grupos de pacientes. Classicamente, a citocina TNF- α por si só não estimula a migração, e cabe destacar que não existem estudos sistematizados que estabeleçam uma relação entre os níveis de expressão de mediadores quimiotáticos combinados com a expressão de moléculas de matriz extracelular e evolução clínica na doença. Porém, quando o TNF- α está associado à fibronectina, pode gerar um aumento significativo tanto no potencial de migração de PBMCs quanto influenciar no percentual de influxo de linfócitos ativados, conforme observado nos dados deste trabalho e outros do grupo (Berbert et al., 2012; Berbert et al., 2014 – manuscrito em preparação). Células T CD8 ativadas, como descrito nos resultados anteriores com fibronectina e CXCL12, tendem a migrar em maior porcentagem em relação às células T CD4 ativadas, gerando uma diferença significativa entre o grupo cardíaco, formado por pacientes moderados e graves, e o grupo controle, determinando assim que essa associação de moléculas é importante na migração funcional dos linfócitos bem como na sua ativação, já que a fibronectina facilita o tráfego celular pelo tecido e o TNF- α é um potente sinalizador para células T, conforme já demonstrado em trabalhos do nosso grupo em migração timocitária em modelo murino (Pérez et al., 2012) e pacientes chagásicos (Kroll-Palhares,

2008). Tomados em conjunto, os dados observados na migração de linfócitos *in vitro* estimulada por fatores potencializadores do evento, como fibronectina, CXCL12 e TNF- α , demonstram que estas moléculas promovem um maior tráfego de subpopulações linfocitárias ao sítio inflamatório, principalmente de células TCD8 citotóxicas, que persistem na resposta crônica ao antígeno parasitário, possivelmente contribuindo para a gravidade dos danos teciduais nessa situação (Berbert et al., 2012; Morrot et al., 2012; Silverio et al., 2012; Berbert et al., 2014 – manuscrito em preparação).

Considerando também a modulação de hormônios do eixo Hipotálamo-adrenal sobre os eventos migratórios, foi também avaliado o potencial de migração das células T dos indivíduos controle e cardíacos (moderados e graves) cultivados previamente com DHEA e cortisol sobre fibronectina, baseado no desequilíbrio resultante destes dois hormônios durante a fase crônica da Doença de Chagas (Pérez et al., 2011). A migração linfocitária *ex vivo* pôde ser modulada por estímulos hormonais, em diferentes concentrações, tanto em indivíduos controle, como nos cardíacos e foi observada uma tendência de aumento do potencial migratório das PBMCs de indivíduos controle após o tratamento hormonal, principalmente quando há diminuição da concentração de DHEA, bem como com a combinação entre o mesmo e o Cortisol, corroborando com o fator biológico do aumento da razão entre cortisol e DHEA observado em pacientes cardíacos chagásicos (Pérez et al., 2011), bem como com malária (Libonati et al., 2006). O estresse causado pelas concentrações de cortisol no sistema promove desequilíbrio em eventos de migração e diferenciação celular, principalmente no timo, órgão gerador de linfócitos (Pérez et al., 2012; Lepletier et al., 2012, 2013 e 2014). Também interessante, dentro do grupo cardíaco, onde foi observado um aumento significativo desse potencial migratório com tratamento hormonal, mesmo estas células já sendo previamente sensibilizadas pelas concentrações fisiológicas sistêmicas destes hormônios durante a infecção crônica destes pacientes, o que demonstra que os linfócitos poderiam ser reestimulados por esses hormônios *in vitro*, aumentando seu potencial migratório, porém, não há dados na literatura que associem estes eventos ao aumento do tráfego de linfócitos em infecções, porém, nossos dados demonstraram uma tendência de influxo de células T CD8 ativadas após os estímulos hormonais, corroborando resultados já descritos neste trabalho e aumentando a importância da combinação de um fator promotor de migração celular como a fibronectina com a modulação imunoendócrina observada nos pacientes.

6 CONCLUSÃO

A alta expressão de citocinas pró-inflamatórias relacionadas à gravidade da cardiopatia, bem como o desequilíbrio na razão cortisol/DHEA neste mesmo contexto, podem ser considerados um delineador da evolução clínica da Doença de Chagas, mesmo sabendo que há uma relação de causa e efeito entre os eventos que ainda não foi bem estabelecida devido ao imenso número de variáveis a serem analisadas na fisiopatologia da doença.

Tomados em conjunto, os fatores apresentados neste trabalho, demonstraram uma intensa relação entre os sistemas imune e endócrino, principalmente entre o conjunto de moléculas já classicamente descritas como quimiotáticas, como FN, CXCL12, e TNF- α e os hormônios do eixo HPA, como DHEA e Cortisol (Fig. 19) e a migração de células T com fenótipo de ativação. O conhecimento sobre a interação destas moléculas nos eventos de migração linfocitária na Doença de Chagas crônica humana pode levar a uma possível intervenção terapêutica sobre o potencial migratório dos linfócitos ao tecido cardíaco infectado, modulado pelo tratamento hormonal com DHEA.

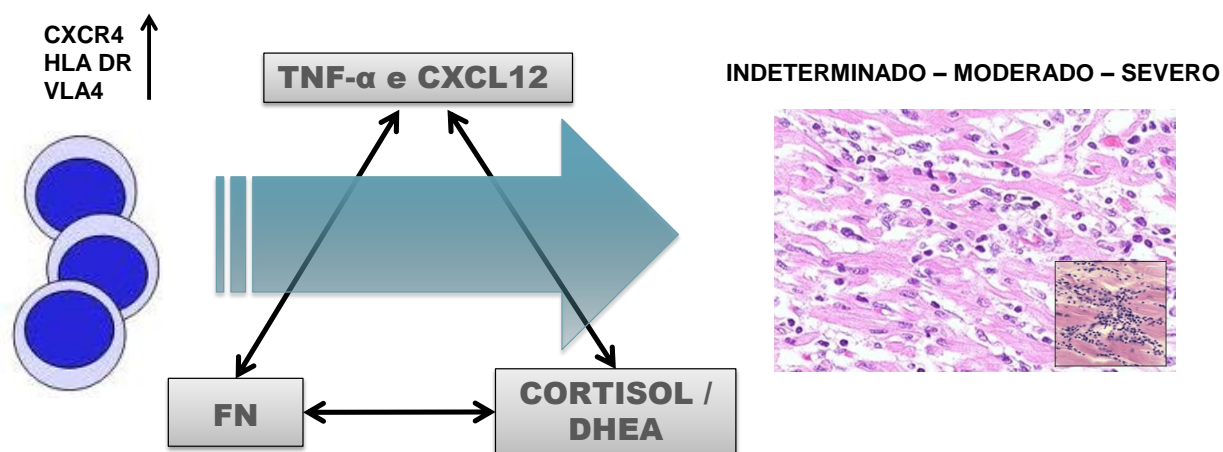


Figura 19. Esquema representativo das conclusões observadas do trabalho de tese. O esquema demonstra que interações imunoendócrinas entre citocinas pró-inflamatórias, proteína de matriz extracelular e hormônios do eixo HPA podem aumentar o potencial migratório de células T ao sítio de inflamação, promovendo uma possível via de geração de cardiopatia chagásica.

7 PERSPECTIVAS

Nos resultados de avaliação funcional de estímulos migratórios, há necessidade de outras combinações entre as moléculas determinadas para o estudo, como por exemplo, associação entre fibronectina, TNF- α e CXCL12 bem como outras que sejam classicamente envolvidas no mesmo estímulo, como a laminina. Dentro desse mesmo contexto, a atividade migratória diferenciada de subpopulações de células TCD4 e CD8, deveria ser avaliada a partir de uma seleção e separação prévia destes grupos de células, comparando, de maneira mais substancial, as diferenças funcionais entre as mesmas. Ensaio de migração transendotelial com estímulos produzidos por células de tecido cardíaco infectadas por *T. cruzi* também demonstrariam um melhor modelo sistêmico *in vitro* para determinação da influência deste complexo de moléculas.

No mesmo contexto descrito na avaliação funcional de estímulos migratórios, há perspectiva da análise da modulação por hormônios do eixo HPA, e sua relação com citocinas, avaliando diferentemente as subpopulações de linfócitos, com pré-tratamento dos hormônios previamente descritos e suas concentrações, somado aos outros estímulos moleculares relacionados ao projeto, como fibronectina, CXCL12, TNF- α e suas combinações, bem como bloqueio dos receptores hormonais.

Para relacionar a expressão das citocinas inflamatórias e ECM descritas no projeto, entre outras, também são necessárias avaliações de co-localização destas moléculas no tecido cardíaco via imunofluorescência. O resultado poderia determinar *in locu*, que a expressão destas moléculas, associadas a outras citocinas e ECM, está associada à formação de infiltrado inflamatório de células T.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ader R. Psychoneuroimmunology. Elsevier, 2007.

Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, Correa-Oliveira R. Potential role of CD4CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci.* 2007;12:2797-806.

Barthélémy I, Pinto-Mariz F, Yada E, Desquilbet L, Savino W, Silva-Barbosa SD, Faussat AM, Mouly V, Voit T, Blot S, Butler-Browne G. Predictive markers of clinical outcome in the GRMD dog model of Duchenne muscular dystrophy. *Dis Model Mech.* 2014;7(11):1253-61.

Beloscar J, Pérez AR, Revelli S. Aportes al conocimiento de la Enfermedad de Chagas. Corpus, 2013.

Berbert LR, Manarín R, Gonzalez FB, Petrucci J, Savino W, Bottasso O, Beloscar J, Pérez AR. The association of Tumor Necrosis Factor-alpha stimulates fibronectin migration of T lymphocytes *ex vivo* in patients with severe chagasic myocarditis. *Rev Fed Arg Cardiol.* 2012; 41(4): 249-53.

Borges DC, Araújo NM, Cardoso CR, Lazo Chica JE. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology.* 2013;138(2):145-56.

Bozza VV, D'Attilio L, Mahuad CV, Giri AA, Del Rey A, Besedovsky H, Bottasso O, Bay ML. Altered cortisol/DHEA ratio in tuberculosis patients and its relationship with abnormalities in the mycobacterial-driven cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Scand J Immunol.* 2007; 66: 97–103.

Brazão V, Santello FH, Caetano LC, Del Vecchio Filipin M, Toldo MP, do Prado JC Jr. Immunomodulatory effects of zinc and DHEA on the Th-1 immune response in rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunobiol.* 2010;215(5):427-34.

Cabrine-Santos M, dos Santos VM, de Lima MA, de Abreu ME, Lages-Silva E, Ramírez LE. Genitourinary changes in hamsters infected and reinfected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(4):523-8.

Caetano LC, Brazão V, Filipin Mdel V, Santello FH, Toldo MP, Caldeira JC, do Prado JC Jr. Corticosterone evaluation in Wistar rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi* during the chronic phase. *Exp Parasitol.* 2011;127(1):31-5.

Caetano LC, Santello FH, Del Vecchio Filipin M, Brazão V, Caetano LN, Toldo MP, Caldeira JC, do Prado Júnior JC. *Trypanosoma cruzi*: dehydroepiandrosterone (DHEA) and immune response during the chronic phase of the experimental Chagas' disease. *Vet Parasitol.* 2009;163(1-2):27-32.

Calvet CM, Oliveira FO Jr, Araújo-Jorge TC, Pereira MC. Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *Int J Med Microbiol.* 2009;299(4):301-12.

Chin E, Arabov Y, Mandel ED. A guide for screening, diagnosing, and managing Chagas disease in the United States. *JAAPA.* 2013;26(9):16-22.

Chittiprol S, Kumar AM, Shetty KT, Kumar HR, Satishchandra P, Rao RS, Ravi V, Desai A, Subbakrishna DK, Philip M, Satish KS, Kumar M. HIV-1 clade C infection and progressive disruption in the relationship between cortisol, DHEAS and CD4 cell numbers: a two-year follow-up study. *Clin Chim Acta.* 2009; 409: 4–10.

Chrousos GP & Kino T. Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1179:153-66.

Cobb D, Smeltz RB. Regulation of proinflammatory Th17 responses during *Trypanosoma cruzi* infection by IL-12 family cytokines. *J Immunol.* 2012;188(8):3766-73.

Corrêa-de-Santana E, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Kenji Nihei O, Gruebler Y, Bozza M, Arzt E, Villa-Verde DM, Renner U, Stalla J, Stalla GK, Savino W. Hypothalamus-pituitary-adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. *J Neuroimmunol.* 2006;173(1-2):12-22.

Correa-de-Santana E, Paez-Pereda M, Theodoropoulou M, Renner U, Stalla J, Stalla GK, Savino W. Modulation of growth hormone and prolactin secretion in *Trypanosoma cruzi*-infected mammosomatotrophic cells. *Neuroimmunomodulation,* 2009; 16(3): 208-12.

Corrêa-de-Santana E, Pinto-Mariz F, Savino W. Immunoneuroendocrine interactions in Chagas disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1088:274-83.

Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circ.* 1974; 49(1): 13-21.

Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Mendes-da-Cruz DA, Riederer I, De Meis J, Lima-Quaresma KR, Vieira-de-Abreu A, Villa-Verde DM, Savino W. *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol.* 2003; 33(9): 2439-48.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(3):286-96.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(6):641-5.

Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002;18(4):171-6.

Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(7):856-62.

Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(8):962-7.

Coura JR. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.* Guanabara Koogan. 2013.

Coura JR. The main scenarios of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 [Epub ahead of print].

Cruz L, Vivas A, Montilla M, Hernández C, Flórez C, Parra E, Ramírez JD. Comparative study of the biological properties of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in a murine experimental model. *Infect Genet Evol.* 2015;29:110-7.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N. Autoimmunity in Chagas Disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(8): 3541-5.

Da Silva AC, Espinoza AG, Taibi A, Ouaisi A, Minoprio P. A 24000 MW *Trypanosoma cruzi* antigen is a B cell activator. Immunol. 1998; 94: 189-96.

De Meis J, Barreto de Albuquerque J, Silva Dos Santos D, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, Cotta-de-Almeida V, Savino W. *Trypanosoma cruzi* Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice. Front Immunol. 2013;4:216.

De Meis J, Mendes-da-Cruz DA, Farias-de-Oliveira DA, Corrêa-de-Santana E, Pinto-Mariz F, Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Savino W. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. Microbes Infect. 2006;8(1):221-31.

De Moura Braz SC, de Melo AS, da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti M, Martins SM, de Oliveira W Jr, da Silva ED, Ferreira AG, de Lorena VM, de Miranda Gomes Y. Increase in the expression of CD4 + CD25+ lymphocytic T cells in the indeterminate clinical form of human Chagas disease after stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. J Clin Immunol. 2014;34(8):991-8.

Del Puerto F, Nishizawa JE, Kikuchi M, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Miura S, Komiya N, Maemura K, Hirayama K. Protective human leucocyte antigen haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against chronic Chagas disease in Bolivia. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(3):e1587.

Del Puerto F1, Kikuchi M, Nishizawa JE, Roca Y, Avila C, Gianella A, Lora J, Gutierrez Velarde FU, Hirayama K. 21-Hydroxylase gene mutant allele CYP21A2*15 strongly linked to the resistant HLA haplotype B*14:02-DRB1*01:02 in chronic Chagas disease. Hum Immunol. 2013;74(6):783-6.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called cruzi complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98: 1-12.

Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC. *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas Disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med*. 2002; 195: 401-13.

Dias JC, Coura JR, Yasuda MA. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(1):123-5.

Dias JCP, Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas: Epidemiologia. Guanabara Koogan. 2000; 48-74.

Dos Santos CD, Toldo MP, Do Prado Júnior JC. *Trypanosoma cruzi*: the effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment during experimental infection. *Acta Tropica*. 2005; 95:109–115.

Dos Santos Virgilio F, Pontes C, Dominguez MR, Ersching J, Rodrigues MM, Vasconcelos JR. CD8(+) T cell-mediated immunity during *Trypanosoma cruzi* infection: a path for vaccine development? *Mediators Inflamm*. 2014:243786.

Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol*. 2014;36(8):377-87.

Duz AL, Vieira PM, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Cardoso JM, Oliveira FC, Reis LE, Tafuri WL, Veloso VM, Reis AB, Carneiro CM. The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(8):1005-13.

Ernestam S, Hafström I, Werner S, Carlström K, Tengstrand B. Increased DHEAS levels in patients with rheumatoid arthritis after treatment with tumor necrosis factor antagonists: evidence for improved adrenal function. *J. Rheumatol*. 2007; 34:1451–58.

Esper L, Utsch L, Soriani FM, Brant F, Esteves Arantes RM, Campos CF, Pinho V, Souza DG, Teixeira MM, Tanowitz HB, Vieira LQ, Machado FS. Regulatory effects of IL-18 on cytokine profiles and development of myocarditis during *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect*. 2014;16(6):481-90.

Evans-Osses I, Mojoli A, Beltrame MH, da Costa DE, DaRocha WD, Velavan TP, de Messias-Reason I, Ramirez MI. Differential ability to resist to complement lysis and invade host cells mediated by MBL in R4 and 860 strains of *Trypanosoma cruzi*. FEBS Lett. 2014;588(6):956-61.

Faé KC, Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Mady C, Kalil J, Goldberg AC. HLA and beta-myosin heavy chain do not influence susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy. Microbes Infect. 2000;2(7):745-51.

Fares RC, Correa-Oliveira R, de Araújo FF, Keesen TS, Chaves AT, Fiuza JA, Ferreira KS, Rocha MO, Gomes JA. Identification of phenotypic markers of B cells from patients with Chagas disease. Parasite Immunol. 2013;35(7-8):214-23.

Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Nunes Panzenhagen PH, Silva dos Santos D, Berbert LR, Savino W, de Meis J. Caspase-8 and caspase-9 mediate thymocyte apoptosis in *Trypanosoma cruzi* acutely infected mice. J Leukoc Biol. 2013;93(2):227-34.

Fearon MA, Scalia V, Huang M, Dines I, Ndao M, Lagacé-Wiens P. A case of vertical transmission of Chagas disease contracted via blood transfusion in Canada. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2013;24(1):32-4.

Fernández ER, Olivera GC, Quebrada Palacio LP, González MN, Hernandez-Vasquez Y, Sirena NM, Morán ML, Ledesma Patiño OS, Postan M. Altered distribution of peripheral blood memory B cells in humans chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. PLoS One. 2014;9(8):e104951.

Ferreira LR, Frade AF, Santos RH, Teixeira PC, Baron MA, Navarro IC, Benvenuti LA, Fiorelli AI, Bocchi EA, Stolf NA, Chevillard C, Kalil J, Cunha-Neto E. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a and miR-208b are dysregulated in Chronic Chagas disease Cardiomyopathy. Int J Cardiol. 2014;175(3):409-17.

Filipin Mdel V, Caetano LC, Brazão V, Santello FH, Toldo MP, do Prado JC Jr. DHEA and testosterone therapies in *Trypanosoma cruzi*-infected rats are associated with thymic changes. Res Vet Sci. 2010;89(1):98-103.

Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H, Parada H, Gutierrez P, Aiello V, Palomino S. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. *Acta Cardiol.* 2005;60(1):33-7.

Gaillard RC, Turnill D, Sappino P, Muller AF. Tumor necrosis factor α inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinol.* 1990;127: 101–6.

Gameiro J, Nagib PR, Andrade CF, Villa-Verde DM, Silva-Barbosa SD, Savino W, Costa FT, Verinaud L.. Changes in cell migration-related molecules expressed by thymic microenvironment during experimental *Plasmodium berghei* infection: consequences on thymocyte development. *Immunol.* 2010;129(2): 248-56.

Garzoni LR, Adesse D, Soares MJ, Rossi MI, Borojevic R, De Meirelles Mde N. Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J Infect Dis.* 2008;197(6):906-15.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010;115(1-2):22-7.

Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 6115-19.

Giraldo NA, Bolaños NI, Cuellar A, Guzman F, Uribe AM, Bedoya A, Olaya N, Cucunubá ZM, Roa N, Rosas F, Velasco V, Puerta CJ, González JM. Increased CD4/CD8 double-positive T cells in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8):e1294.

Giraldo NA, Bolaños NI, Cuellar A, Roa N, Cucunubá Z, Rosas F, Velasco V, Puerta CJ, González JM. T lymphocytes from chagasic patients are activated but lack proliferative capacity and down-regulate CD28 and CD3 ζ . *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e2038.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, Correa-Oliveira R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun*. 2005;73(12):7960-6.

Gomes JA, Molica AM, Keesen TS, Morato MJ, de Araujo FF, Fares RC, Fiuza JA, Chaves AT, Pinheiro V, Nunes Mdo C, Correa-Oliveira R, da Costa Rocha MO. Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. *Hum Immunol*. 2014;75(1):20-8.

Gómez-García L, Alejandre-Aguilar R, Aranda-Fraustro A, Lopez R, Monteón VM. Description of inflammation and cytokine profile at the inoculation site and in heart tissue of mice re-infected with *Trypanosoma cruzi* vector derived-metacyclic trypomastigotes. *Parasitology*. 2005;130(5):511-22.

González FB, Villar SR, Fernández Bussy R, Martin GH, Pérol L, Manarin R, Spinelli SV, Pilon C, Cohen JL, Bottasso OA, Piaggio E, Pérez AR. Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled T. cruzi infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3+ T cells. *Brain Behav Immun*. 2014;(14)00560-1.

Guimaro MC, Alves RM, Rose E, Sousa AO, de Cássia Rosa A, Hecht MM, Sousa MV, Andrade RR, Vital T, Plachy J, Nitz N, Hejnar J, Gomes CC, L Teixeira AR. Inhibition of autoimmune Chagas-like heart disease by bone marrow transplantation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(12):e3384.

Hamaty FC. Análise de células CD4+CD25+FoxP3+ no timo de camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado, 2008; Inst Oswaldo Cruz-RJ.

Hazeldine J, Arlt W, Lord JM. Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function. *J Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2010; 120(2–3): 127–36.

Hidalgo R, Martí-Carvajal AJ, Kwong JS, Simancas-Racines D, Nicola S. Pharmacological interventions for treating heart failure in patients with chagas cardiomyopathy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;11:CD009077.

Higushi M, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology in heart in Chagas Disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 2003; 60: 96-107.

Ivanoff J, Talme T, Sundqvist KG. The role of chemokines and extracellular matrix components in the migration of T lymphocytes into three-dimensional substrata. *Immunol.* 2005;114(1): 53-62.

Jaattela M, Ilvesmäki V, Voutilainen R, Stenman UH, Saksela E. Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinol.* 1991; 128, 623–9.

Jasmin, Jelicks LA, Tanowitz HB, Peters VM, Mendez-Otero R, Campos de Carvalho AC, Spray DC. Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. *Microbes Infect.* 2014;16(11):923-35.

Juruena MF, Cleare AJ, Pariante CM. The Hypothalamic Pituitary Adrenal axis, Glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004. 26(3):189-201.

Kalil J, Cunha-Neto E. Autoimmunity in Chagas Disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today.* 1996; 12(10): 396-9.

Keenan M, Chaplin JH. A new era for chagas disease drug discovery? *Prog Med Chem.* 2015;54:185-230.

Kierszbaum F & Szein MB. Mechanisms underlying immunosuppression induced by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 1990; 6(8): 261-4.

Knoferl MW, Angele MK, Catania RA, Diodato MD, Bland KI, Chaudry IH. Immunomodulatory effects of dehydroepiandrosterone in proestrus female mice after trauma-hemorrhage. *J Appl Physiol.* 2003; 95: 529–35.

Kuehn CC, Oliveira LG, Miranda MA, Prado JC. Distinctive histopathology and modulation of cytokine production during oral and intraperitoneal *Trypanosoma cruzi* Y strain infection. *Parasitology.* 2014;141(7):904-13.

Kuehn CC, Oliveira LG, Santos CD, Augusto MB, Toldo MP, do Prado JC Jr. Prior and concomitant dehydroepiandrosterone treatment affects immunologic response of cultured macrophages infected with *Trypanosoma cruzi in vitro*? Vet Parasitol. 2011;177(3-4):242-6.

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. 2003;98(3):299-304.

Leite de Moraes MC, Coutinho A, Hontenbeiry-Joscowitz M, Minoprio P, Eisen H, Bandeira A. Skewed V betaTCR repertoire of CD8 T cells in murine *Trypanosoma cruzi* infection. Int Immunol. 1994a; 6(3): 387-92.

Lemos JR, Rodrigues WF, Miguel CB, Parreira RC, Miguel RB, de Paula Rogerio A, Oliveira CJ, Chica JE. Influence of parasite load on renal function in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. PLoS One. 2013;8(8):e71772.

Lenzi HL, Castelo-Branco MT, Pelajo-Machado M, Oliveira DN, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection. Acta Trop. 1998;71(2):117-29.

Lepletier A, de Carvalho VF, Rodrigues e Silva PM, Villar S, Pérez AR, Savino W, Morrot A. *Trypanosoma cruzi* disrupts thymic homeostasis by altering intrathymic and systemic stress-related endocrine circuitries. PLoS Negl Trop Dis. 2013.14;7(11):e2470.

Lepletier A, Frias Carvalho V, Morrot A, Savino W. Thymic atrophy in acute experimental Chagas disease is associated with an imbalance of stress hormones. Ann N Y Acad Sci. 2012;1262:45-50.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat Rev Immunol , 2007; 7:678-89.

Libonati RM, de Mendonça BB, Maués JA, Quaresma JA, de Souza JM. Some aspects of the behavior of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: Cortisol and dehydroepiandrosterone levels. *Acta Trop.* 2006;98(3):270-6.

Lima-Martins MV. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. *Parasite Immunol.* 1985; 7: 367-76

Lo Presti MS, Bazán PC, Strauss M, Báez AL, Rivarola HW, Paglini-Oliva PA. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. *Acta Trop.* 2015;145:79-87.

Longhi SA, Atienza A, Perez Prados G, Buying A, Balouz V, Buscaglia CA, Santos R, Tasso LM, Bonato R, Chiale P, Pinilla C, Judkowski VA, Gómez KA. Cytokine production but lack of proliferation in peripheral blood mononuclear cells from chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients in response to *T. cruzi* ribosomal P proteins. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(6):e2906.

Luppi P, Rudert WA, Zanone MM, Stassi G, Truco G, Finegold D. Idiopathic dilated cardiomyopathy: a superantigen driven autoimmune disease. *Circulation.* 1998; 98(8): 777-85.

Magalhães LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis.* 2013;207(4):661-5.

Magalhaes-Santos IF, Lima ES, Andrade SG. Fibrogenesis and collagen resorption in the heart and skeletal muscle of *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: immunohistochemical identification of extracellular matrix components. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(5):703-10.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic heart Chagas Disease. *Circulation.* 2007; 115: 1109-23.

Marino AP, Silva AA, Santos PV, Pinto LM, Gazinelli RT, Teixeira MM, Lannes-Vieira J. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(1):93-6.

Martins GA, Vieira LQ, Cunha FQ, Silva JS. Gamma Interferon modulates CD95 (Fas) and CD95L (Fas-L) expression and nitric oxide induced apoptosis during acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun*, 1999; 67(8), 3864-71.

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*. 2014;130:167-74,

Mattos EC, Schumacher RI, Colli W, Alves MJ. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to fibronectin or laminin modifies tubulin and paraflagellar rod protein phosphorylation. *PLoS One*. 2012;7(10):e46767.

McLean BA, Oudit GY. Role of autoimmunity in heart disease: is Chagas heart disease the definitive proof? *Can J Cardiol*. 2014;30(3):267-9.

Mendes-da-Cruz DA, de Meis J, Cotta-de-Almeida V, Savino W. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection alters the shaping of the central and peripheral T-cell repertoire. *Microbes Infect*. 2003;5(10):825-32.

Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Cotta-de-Almeida V, Savino W. Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *Eur J Immunol*. 2006; 36(6): 1486-93.

Meza SK, Kaneshima EN, Silva Sde O, Gabriel M, de Araújo SM, Gomes ML, Monteiro WM, Barbosa Md, Toledo MJ. Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. *Exp Parasitol*. 2014;146:34-42.

Minoprio PM. Polyclonal lymphocyte response to murine *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of both T- and B-cell response. *Scand. J. Immunol*. 1986; 24: 661-8.

Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimano Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2010;185(2):1150-7.

Morrot A, Barreto de Albuquerque J, Berbert LR, de Carvalho Pinto CE, de Meis J, Savino W. Dynamics of Lymphocyte Populations during *Trypanosoma cruzi* Infection: From Thymocyte Depletion to Differential Cell Expansion/Contraction in Peripheral Lymphoid Organs. *J Trop Med*. 2012;747185.

Morrot A, Terra-Granado E, Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Milićević NM, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, De Meis J, Takiya CM, Beloscar J, Wang X, Kont V, Peterson P, Bottasso O, Savino W. Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4CD8 T cells in severe forms of human disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(8):e1268.

Nardy AF, Luiz da Silva Filho J, Pérez AR, de Meis J, Farias-de-Oliveira DA, Penha L, de Araújo Oliveira I, Dias WB, Todeschini AR, Freire-de-Lima CG, Bellio M, Caruso-Neves C, Pinheiro AA, Takiya CM, Bottasso O, Savino W, Morrot A. Transsialidase from *Trypanosoma cruzi* enhances the adhesion properties and fibronectin-driven migration of thymocytes. *Microbes Infect*. 2013;15(5):365-74.

Nde PN, Lima MF, Johnson CA, Pratap S, Villalta F. Regulation and use of the extracellular matrix by *Trypanosoma cruzi* during early infection. *Front Immunol*. 2012;3:337.

Nieto A, Beraún Y, Collado MD, Caballero A, Alonso A, González A, Martín J. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens*. 2000;55(3):195-8.

Okamoto EE, Sherbuk JE, Clark EH, Marks MA, Gandarilla O, Galdos-Cardenas G, Vasquez-Villar A, Choi J, Crawford TC, Q R, Fernandez AB, Colanzi R, Flores-Franco JL, Gilman RH, Bern C1; Chagas Disease Working Group in Bolivia and Peru. Biomarkers in *Trypanosoma cruzi*-infected and uninfected individuals with varying severity of cardiomyopathy in Santa Cruz, Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):e3227.

Paiva CN, Figueiredo RT, Kroll-Palhares K, Silva AA, Silvério JC, Gibaldi D, Pyrrho Ados S, Benjamim CF, Lannes-Vieira J, Bozza MT. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol*. 2009;86(5):1239-46.

Pérez AR, Berbert LR, Lepletier A, Revelli S, Bottasso O, Silva-Barbosa SD, Savino W. TNF- α is involved in the abnormal thymocyte migration during experimental *Trypanosoma cruzi* infection and favors the export of immature cells. PLoS One. 2012;7(3):e34360

Pérez AR, Bertoya AA, Revelli S, García F. A high corticosterone/DHEA-s ratio in young rats infected with *Trypanosoma cruzi* is associated with increased susceptibility. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106(4):416-23.

Pérez AR, Morrot A, Berbert LR, Terra-Granado E, Savino W. Extrathymic CD4CD8 lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance. Ann N Y Acad Sci. 2012;1262: 27-36.

Pérez AR, Roggero E, Nicora A, Palazzi J, Besedovsky HO, Del Rey A, Bottasso OA. Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. Brain Behav Immun. 2007; 21:890-900.

Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Berbert LR, Revelli S, Beloscar J, Savino W, Bottasso O. Immunoendocrine alterations in patients with progressive form of chronic Chagas Disease. Brain Behav Immun. 2011; 235(1-2):84-90.

Piccirillo CA. Regulatory T cells in health and disease. Cytokine. 2008; 43: 395-401.

Piedras J, Gutierrez S, Reyes-López PA, Reyes K, López-Karpovitch X, Monteón V. Circulating lymphocyte subpopulations and activated T and B cells in patients with chagasic and non-chagasic cardiomyopathy. Cytometry. 1997;30(1):28-32.

Pimentel Wde S, Ramires FJ, Lanni BM, Salemi VM, Bilate AM, Cunha-Neto E, Oliveira AM, Fernandes F, Mady C. The effect of beta-blockade on myocardial remodeling in Chagas' cardiomyopathy. Clinics (Sao Paulo). 2012;67(9):1063-9.

Pinto-Mariz F, Carvalho LR, de Mello W, Araújo Ade Q, Ribeiro MG, Cunha Mdo C, Voit T, Butler-Browne G, Silva-Barbosa SD, Savino W. Differential integrin expression by T lymphocytes: potential role in DMD muscle damage. J Neuroimmunol. 2010;223(1-2):128-30.

Pissetti CW, Correia D, de Oliveira RF, Llaguno MM, Balarin MA, Silva-Grecco RL, Rodrigues V Jr. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(3):e976.

Poveda C, Fresno M, Gironès N, Martins-Filho OA, Ramírez JD, Santi-Rocca J, Marin-Neto JA, Morillo CA, Rosas F, Guhl F. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). PLoS One. 2014;9(3):e91154.

Poveda C, Fresno M, Gironès N, Martins-Filho OA, Ramírez JD, Santi-Rocca J, Marin-Neto JA, Morillo CA, Rosas F, Guhl F. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). PLoS One. 2014;9(3):e91154.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas Disease. Lancet Infect Dis. 2001; 1(2): 92-100.

Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas heart disease. Int J Cardiol. 2007;115(3):279-83.

Reis Machado J, Silva MV¹, Borges DC, da Silva CA, Ramirez LE, dos Reis MA, Castellano LR, Rodrigues V, Rodrigues DB. Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* reinfections. Biomed Res Int. 2014;2014:648715.

Reis MM, Higuchi ML, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL2R in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *T. cruzi*. Clin Immunol Immunopathol. 1997; 83:165-72.

Rey L. Bases da Parasitologia Médica. Guanabara Koogan. 2011; 27-42.

Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. Nat Rev Cardiol. 2012 Oct;9(10):576-89.

Ribeiro-dos-Santos R, Laus JL, Mengels J, Savino W. Chronic chagasic cardiopathy: role of CD4 T cells in anti heart autoreactivity. Mem Int Oswaldo Cruz. 1990; 85: 367-69.

Ribeiro-dos-Santos R, Pirmez C, Savino W. Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. Res Immunol. 1991; 142: 134-7.

Ribeiro-dos-Santos R, Rossi MA, Laus JL, Santana-Silva J, Savino W, Mengels J. Anti CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngenic newborn hearts grafted in mice chronically infected by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 1992; 175(1): 29-39.

Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira Vde P, Tostes S Jr, Rodrigues V Jr. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol*. 2012;361730.

Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira Vde P, Tostes S Jr, Rodrigues V Jr. *In situ* expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:361730.

Roggero E, Pérez AR, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Besedovsky HO, Bottasso OA, Del Rey A.. Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Endocrinol*. 2006. 190(2):495-503.

Roggero E, Wildmann J, Passerini MO, del Rey A, Besedovsky HO. Different peripheral neuroendocrine responses to *Trypanosoma cruzi* infection in mice lacking adaptive immunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1262:37-44.

Sánchez LV, Ramírez JD. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology*. 2013;140(2):147-59.

Sanoja C, Carbajosa S, Fresno M, Gironès N. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One*. 2013;8(6):e65820.

Santos CD, Loria RM, Oliveira LG, Kuehn CC, Toldo MP, Albuquerque S, do Prado JC Jr. Effects of dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) and benznidazole treatments during acute infection of two different *Trypanosoma cruzi* strains. *Immunobiology*. 2010;215(12):980-6.

Santos CD, Toldo MP, Levy AM, Kawasse LM, Zucoloto S, do Prado JC Jr. Dehydroepiandrosterone affects *Trypanosoma cruzi* tissue parasite burdens in rats. *Acta Trop.* 2007;102(3):143-50.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009;104(1): 246-51

Savino W, Leite-de-Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicks M, Dardenne M. Studies on the Thymus on Chagas Disease. I – Changes in thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol.* 1989; 19: 1727-33.

Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol.* 2004;75(6): 951-61.

Savino W, Smaniotto S, Mendes-da-Cruz DA, Dardenne M. Growth hormone modulates migration of thymocytes and peripheral T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1261:49-54.

Savino W, Villa-Verde DMS, Mendes-da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki MP, et al. Cytokines and cell adhesion receptors in regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine and Growth Factor Rev.* 2007; 18:107-24.

Savino W. Intrathymic T cell migration is a multivectorial process under a complex neuroendocrine control. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17(3):142-5.

Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *Plos Pathol.* 2006; 2(6): e62.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010;115(1-2):14-21.

Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 2012;54:845–52.

Sigmundsdottir H, Butcher EC. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol.* 2008; 9:981-7.

Silva-Barbosa SD & Savino W. The involvement of laminin in anti-myocardial cell autoimmune response in murine Chagas disease. *Dev Immunol.* 2000;7(2-4):293-301.

Silva-Barbosa SD, Cotta-de-Almeida V, Riederer I, De Meis J, Dardenne M, Bonomo A, Savino W. Involvement of laminin and its receptor in abrogation of heart graft rejection by autoreactive T cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Immunol.* 1997;159(2):997-1003.

Silveira AC. New challenges and the future of control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44(2), 122–24.

Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli Mda C, Vinagre NF, Rodrigues MM, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. CD8 T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002645.

Smaniotto S, Mendes-da-Cruz DA, Carvalho-Pinto CE, Araujo LM, Dardenne M, Savino W. Combined role of extracellular matrix and chemokines on peripheral lymphocyte migration in growth hormone transgenic mice. *Brain Behav Immun.* 2010;24(3):451-61.

Sousa GR, Gomes JA, Fares RC, Damásio MP, Chaves AT, Ferreira KS, Nunes MC, Medeiros NI, Valente VA, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PLoS One.* 2014;9(3):e87082.

Souza-Lima RC, Barbosa MD, Coura JR, Arcanjo AR, Nascimento Ada S, Ferreira JM, Magalhães LK, Albuquerque BC, Araújo GA, Guerra JA. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(4):510-4.

Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TC, Stoco PH, Murta SM, de Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60(1):25-32.

Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol*, 2014; 103:1–10.

Straub RH, Lehle K, Herfarth H, Weber M, Falk W, Preuner J, Scholmerich J. Dehydroepiandrosterone in relation to other adrenal hormones during an acute inflammatory stressful disease state compared with chronic inflammatory disease: role of interleukin-6 and tumour necrosis factor. *Eur J Endocrinol*. 2002; 146: 365–74.

Sullivan NL, Eickhoff CS, Zhang X, Giddings OK, Lane TE, Hoft DF. Importance of the CCR5-CCL5 axis for mucosal *Trypanosoma cruzi* protection and B cell activation. *J Immunol*. 2011;187(3):1358-1368.

Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*. 2004;38(7):943-50.

Tanowitz HB, Kirschhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas Disease. *Clin Microbiol*. 1992; 5(4): 400-19.

Tarleton RL, De Andrade PP, De Andrade CR. Interleukin-2 production in patients with Chagas Disease: correlation with anti parasite antibody responses. *Immunol Lett*. 1988; 17: 229-34.

Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin in Immunol*. 2007; 19:430-34.

Tostes S, Rocha-Rodrigues DB, de Araujo-Pereira G. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol*. 2005;18(99):233-7.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO.. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat cell biol*. 2007; 9: 654–9.

Vankelecom H, Carmeliet P, Heremans H, Van Damme J, Dijkmans R, Billiau A, Deneef C, 1990. Interferon-g inhibits stimulated adrenocorticotropin, prolactin, and growth hormone secretion in normal rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinol*. 1990; 126:2919–26.

Villar SR, Ronco MT, Fernández Bussy R, Roggero E, Lepletier A, Manarin R, Savino W, Pérez AR, Bottasso O. Tumor necrosis factor- α regulates glucocorticoid synthesis in the adrenal glands of *Trypanosoma cruzi* acutely-infected mice. The role of TNF-R1. PLoS One. 2013;8(5): 63814.

Vitelli-Alvelar DM, Sathler-Alvelar R, Dias JC, Teixeira-Carvalho A, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho AO. Chagasic patients with indeterminate clinical form of disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4CD25+ regulatory T lymphocytes. Scand J Immunol. 2006; 62(3): 297-308.

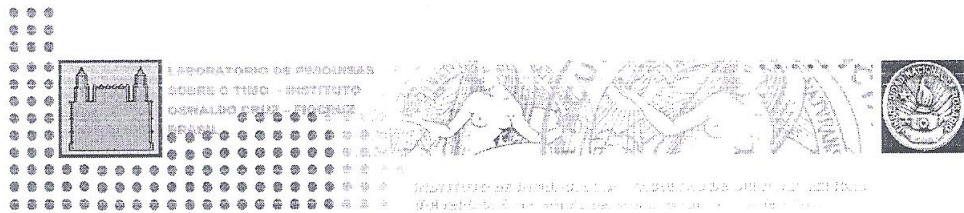
Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4CD25^{High} T cells balancing activated CD8 T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? Clin Exp Immunol. 2006; 145: 81-92.

Yen SS. Relationship with the severity of pulmonary involvement. Dehydroepiandrosterone sulfate and longevity: new clues for an old friend. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2001;98:8167–8169.

Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(1):101-7.

9 ANEXOS

9.1 DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO CEDIDA AOS PACIENTES DO PRESENTE ESTUDO DE COLABORAÇÃO FIOCRUZ – UNIVERSIDADE NACIONAL DE ROSARIO.



Programa de Investigación en Chagas

Instituto de Inmunología y Carrera de Especialización en Cardiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR, Argentina. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Estimado Señor/a: Profesionales de la Universidad Nacional de Rosario y del Instituto Oswaldo Cruz han proyectado un estudio de investigación titulado: *"Estudios fenotípicos y Funcionales en células inmunocompetentes de sujetos con evidencia serológica de infección por Trypanosoma cruzi. Respuesta inmuno-endócrina y su relación con la capacidad migratoria de células T y la severidad de la patología"*.

Por haber vivido en zona de vinchucas y haber sido picado/a por ellas, o por ser hijo/a de madre con Chagas o bien por haber recibido una transfusión de sangre contaminada con el parásito, Ud. tiene la Enfermedad de Chagas. El parásito ha tomado contacto con su sangre y las defensas del cuerpo han tratado de luchar contra ese agresor. De esta forma puede suceder que el parásito sea controlado o bien que su corazón se enferme.

Existen medicamentos que tratan de eliminar al parásito, pero su eficacia depende de cada persona y del momento de la enfermedad que se administre.

Este estudio pretende identificar y clasificar a las células que combaten la infección y a otros factores solubles que intervienen en el proceso de la enfermedad. Los resultados de esos estudios probablemente nos ayuden a identificar otros tipos de medicamentos o terapias que puedan prevenir o curar la Enfermedad de Chagas.

Si Ud. está de acuerdo, le tomaremos una breve historia clínica, le haremos un electrocardiograma y radiografía de tórax y/o ecocardiograma y le extraeremos sangre de su brazo. Una vez que tengamos los resultados de la investigación le informaremos a su médico de los nuevos conocimientos adquiridos.

El Servicio de Cardiología del Hospital Centenario y su Consultorio de Enfermedad de Chagas están a su disposición.

Muchas gracias por su colaboración !!!!

9.2 FICHA CLÍNICA DOS PACIENTES DE ESTUDO (FRENTE E VERSO) COM AVALIAÇÃO DO CARDIOLOGISTA RESPONSÁVEL.

Ficha Clínica Nro:.....

Nombre y Apellido:

Edad: Lugar y fecha de nacimiento:

Domicilio actual:

Tiempo de residencia en zona endémica:

Tiempo de residencia en Rosario (fecha de migración):

Teléfono:

Ocupación:

Nivel de estudios:

Fecha aproximada de diagnóstico de Chagas:

Circunstancias del diagnóstico:

Laboral Embarazo..... Dador de sangre.....Servicio militar.....

Chequeo..... Síntomas o signos..... Otros.....

Cigarrillo/día:..... Fuma desde que edad:.....

Alcohol (Si/no): Bebida /Cantidad diaria:.....

Otros factores de riesgo conocidos:.....

Otras enfermedades asociadas:.....

Serología (constar títulos y fechas):.....

HAI..... ELISA..... IFI.....

Síntomas/Signos relacionables a la enfermedad de Chagas a la fecha:.....

.....

.....

.....

.....

Medidas antropométricas:

Peso:..... Altura:

Circunferencia de cintura:

Circunferencia de cadera:

Circunferencia de brazo:

Presión arterial:..... Frecuencia cardíaca:.....

Rx de tórax: ICT> 0.55 No Si

ECG: Normal Alterado

.....
.....
.....
.....

Ecocardiograma: Normal Alterado

.....
.....

Otros exámenes complementarios:

.....
.....
.....
.....

Período de Enfermedad de Chagas

Crónico Indeterminado

Crónico con cardiopatía: LEVE MODERADA SEVERA

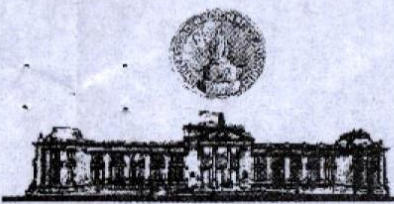
- a) Arritmias y/o trastornos de conducción y/o trastornos primarios Q-ST-T
- b) Insuficiencia cardíaca

Fecha:


Investigador Derivante:

9.3 8.3 DECLARACIÓN DO COMITÉ DE ÉTICA PARA USO DE AMOSTRAS DE PACIENTES DO ESTUDO

"2007 – Año de la Seguridad Vial"



Expte. N° 43665/0019
Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Rosario
ROSARIO, 28 de agosto de 2007.-



VISTO: la presente nota mediante la cual el Director del Instituto de Inmunología, Dr. Oscar A. Bottasso, eleva para su evaluación el proyecto de investigación titulado: "Estudios fenotípicos y funcionales en células inmunocompetentes de sujetos con evidencia serológica de infección por *Trypanosoma cruzi*"; y

CONSIDERANDO:

QUE, la Comisión de Bioética de esta Casa de Estudios ha emitido su opinión en estas actuaciones concluyendo que lo considera aceptable desde el punto de vista ético;

QUE, de acuerdo a lo informado por la citada Comisión, la Secretaría de Ciencia y Técnica de esta Institución sugiere se autorice la realización del proyecto de referencia desde el punto de vista ético;

POR ELLO,

EL DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

RESUELVE:

ARTICULO 1º.- Autorizar desde el punto de vista ético el proyecto de investigación titulado "ESTUDIOS FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES EN CELULAS INMUNOCOMPETENTES DE SUJETOS CON EVIDENCIA SEROLOGICA DE INFECCION POR *TRYPANOSOMA CRUZI*", dirigido por el Dr. Oscar Adelmo BOTTASSO (DNI N° 10.246.713) por los motivos enunciados en la presente resolución.-


ARTICULO 2º.- Regístrese, comuníquese y gírese a la Secretaría de Ciencia y Técnica para su conocimiento y notificación fehacientemente del interesado. Cumplido, archívese.-

RESOLUCION N° 496/2007.-

int
CYT
cumplido

Mrdb/go.-

Santa Fe 3100 – Rosario (2000) Te: (0341) 480 4558 al 62 www.fmmedic.unr.edu.ar


Prof. Dr. Carlos D. Crisci
Decano

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS MESA DE ENTRADAS Y SALIDAS	
ENTRÓ	SALIÓ
12/9/07	13/9/07

Secretaría y Técnica

9.4 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA REFERENTE À TESE DE DOUTORADO

Berbert LR, Manarín R, Gonzalez FB, Petrucci J, Savino W, Bottasso O, Beloscar J, Pérez AR. The association of Tumor Necrosis Factor-alpha stimulates fibronectin migration of T lymphocytes ex vivo in patients with severe chagasic myocarditis. Rev Fed Arg Cardiol. 2012; 41(4): 249-53.

Berbert LR, Silva-Balbosa SD; González FB; Villar S; Manarin R; Beloscar J; Bottasso O; Pérez AR; Savino W. Enhanced migratory capacity of T lymphocytes in chagasic patients with severe degree of heart disease are linked to VLA-4 and TNF- α expression. 2015. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO.

Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Berbert LR, Revelli S, Beloscar J, Savino W, Bottasso O. Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive forms of chronic Chagas disease. J Neuroimmunol. 2011;235(1-2):84-90.

9.5 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA REFERENTE AO PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO DA TESE DE DOUTORADO

De Meis J, Barreto de Albuquerque J, Silva Dos Santos D, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, Cotta-de-Almeida V, Savino W. *Trypanosoma cruzi* Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice. *Front Immunol.* 2013;4:216.

Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Nunes Panzenhagen PH, Silva dos Santos D, Berbert LR, Savino W, de Meis J. Caspase-8 and caspase-9 mediate thymocyte apoptosis in *Trypanosoma cruzi* acutely infected mice. *J Leukoc Biol.* 2013;93(2):227-34.

Morrot A, Barreto de Albuquerque J, Berbert LR, de Carvalho Pinto CE, de Meis J, Savino W. Dynamics of Lymphocyte Populations during *Trypanosoma cruzi* Infection: From Thymocyte Depletion to Differential Cell Expansion/Contraction in Peripheral Lymphoid Organs. *J Trop Med.* 2012;2012:747185.

Morrot A, Terra-Granado E, Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Milićević NM, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, De Meis J, Takiya CM, Beloscar J, Wang X, Kont V, Peterson P, Bottasso O, Savino W. Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4CD8 T cells in severe forms of human disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8):e1268.

Pérez AR, Berbert LR, Lepletier A, Revelli S, Bottasso O, Silva-Barbosa SD, Savino W. TNF- α is involved in the abnormal thymocyte migration during experimental *Trypanosoma cruzi* infection and favors the export of immature cells. *PLoS One.* 2012;7(3):e34360.

Pérez AR, Morrot A, Berbert LR, Terra-Granado E, Savino W. Extrathymic CD4CD8 lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1262:27-36.