FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES

Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Michelle da Silva Barros

AVALIAÇÃO DAS QUIMIOCINAS CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG E CXCL10/IP-10 EM SORO DE PACIENTES COM AS FORMAS CLÍNICAS CARDÍACA E INDETERMINADA DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Recife

MICHELLE DA SILVA BARROS

AVALIAÇÃO DAS QUIMIOCINAS CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG E CXCL10/IP-10 EM SORO DE PACIENTES COM AS FORMAS CLÍNICAS CARDÍACA E INDETERMINADA DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Dissertação apresentada ao curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Morais

Coorientadora: Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Catalogação na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

B277a

Barros, Michelle da Silva

Avaliação das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 em soro de pacientes com as formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica / Michelle da Silva Barros. Recife: [s.n.], 2018.

71 p.: il., tab., graf.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018

Orientadora: Clarice Neuenschwander Lins de Morais; coorientador: Virginia Maria Barros de Lorena.

1. Doença de Chagas - imunologia. 2. Doença de Chagas - patologia. 3. Biomarcadores. 4. Quimiocinas - sangue. 5. Doença crônica. 6. Trypanosoma cruzi - isolamento & purificação. I. Morais, Clarice Neuenschwander Lins de. II. Lorena, Virginia Maria Barros de. III. Título.

CDU 616.937

MICHELLE DA SILVA BARROS

AVALIAÇÃO DAS QUIMIOCINAS CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG E CXCL10/IP-10 EM SORO DE PACIENTES COM AS FORMAS CLÍNICAS CARDÍACA E INDETERMINADA DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Dissertação apresentada ao curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovado em: 26/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Dra Milena de Paiva Cavalcanti Instituto Aggeu Magalhães / FIOCRUZ

Dra Vláudia Maria Assis CostaUniversidade Federal de Pernambuco

Dra Clarice Neuenschwander Lins de Morais Instituto Aggeu Magalhães / FIOCRUZ

Dedico este trabalho aos pacientes Chagásicos,
pois sem eles, nada disso seria
possível.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que é meu guia, minha calma, meu acalanto desde o primeiro dia de curso. Fortaleci ainda mais minha fé, estreitei ainda mais meus laços com Ele. Sem Ti, eu nada seria.

Agradeço por TODAS as pessoas que o Senhor colocou em meu caminho. As boas e as más, pois tudo nessa vida é lição. Elas me serviram de inspiração, me ajudaram, me desafiaram e me encorajaram a ser cada dia e cada vez melhor, cada um com sua forma.

A minha família, que mesmo distante, emanavam pensamentos positivos e deram forças para que eu continuasse essa caminhada tão solitária por tanto tempo. Amo incondicionalmente vocês.

Aos meus amigos "Dramáticos" Crhisllane, Lays, Leyllane e Rodrigo, os causadores das doses diárias de alegria. Seja com uma mensagem de bom dia, com um almoço animado no quiosque ou um "pote dos sonhos" no final da tarde pra abstrair. Não sei o quanto eu aguentaria sem esses momentos. Só tenho amor a sentir por cada um de vocês.

Aos queridos Crhisllane e Rodrigo novamente, pois os mesmos tiveram um papel muito importante na correção das minhas normas da ABNT.

Aos amigos que deixei na minha amada Maceió, pelo incentivo quase que diário e pelos momentos de descontração quando nos encontramos. Foi muito renovador cada churrasco ou noite da pizza, para que pudesse voltar a rotina tão pesada de trabalho e estudos.

As minhas orientadoras, Virginia e Clarice, que em muitos momentos foram mais que formadoras intelectuais, foram parceiras de vida. Me mostrando que os tropeços, vitórias e derrotas, dão o verdadeiro significado da palavra 'conquistar'.

Por fim, agradeço ao meu amigo e companheiro de trabalho Mineo Nakazawa, pois sem suas palavras de conforto, sua calma, ou até só por me ouvir, me ajudou mais do que eu poderia imaginar e eu não teria conseguido em muitos momentos passar pelas dificuldades sem nossas breves meditações. Muito obrigada!

O conhecimento serve para encantar as pessoas, não para humilhá-las. (Mario Sergio Cortella) BARROS, Michelle da Silva. <u>Avaliação das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 em soro de pacientes com as formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica.</u> 2018. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

A ação da resposta imunológica na defesa contra o Trypanosoma cruzi têm-se mostrado muito importante no processo de evolução das diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas crônica. Sendo as quimiocinas, importantes mediadores envolvidos na manutenção do processo inflamatório, podendo estar associadas a um mal prognóstico da doença crônica. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar o nível das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 em soro de portadores crônicos das formas clínicas: Indeterminada (A=30), Cardíaca leve (B1=34) e Cardíaca grave (C=31) da doença de Chagas, além do grupo controle negativo (NEG=20). Os ensaios foram realizados por Cytometric Beads Array (CBA) utilizando o kit Human Chemokine (BD Biosciences). Os dados foram analisados usando o software PRISM 6.0 Windows®. Nossos resultados mostram que níveis de quimiocinas estão significativamente mais elevados quando analisamos toda a população de indivíduos infectados comparando com o grupo NEG. Na avaliação das quimiocinas CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10, não observamos diferença estatística entre os grupos de pacientes infectados. Quanto à CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8, verificamos que indivíduos do grupo C apresentaram níveis menores quando comparados aos indivíduos dos grupos A e B1. Além disso, indivíduos do grupo B1 apresentaram maiores níveis de concentração de CCL5/RANTES quando comparados aos indivíduos do grupo C. Sugerindo um possível mecanismo de regulação da inflamação em indivíduos portadores das formas clínicas A e B1. Observamos uma correlação positiva moderada entre CCL2/MCP-1 e %FEVE (fração de ejeção do ventrículo esquerdo) nos indivíduos do grupo A e C. Concluímos que um estudo de seguimento desses pacientes se faz necessário para uma melhor compreensão dos mecanismos da patogênese da doença e consequentemente nos auxiliar na busca de possíveis biomarcadores de evolução clínica e alvos terapêuticos.

Palavras-chaves: Doença de Chagas, Imunopatogênese, Biomarcador.

BARROS, Michelle da Silva. <u>Evaluation of the chemokines CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG and CXCL10/IP-10 in serum of in serum patients with the cardiac and indeterminated clinical forms of chronic chagas disease.</u> 2018. Dissertation (Master's degree in Biosciences and Biotechnology in Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Fundation, Recife, 2018.

ABSTRACT

The action of the immune response in defense against *Trypanosoma cruzi* has been shown to be very important in the evolution process of the different clinical manifestations of chronic Chagas' disease. Being the chemokines, important mediators involved in the maintenance of the inflammatory process, and may be associated with poor prognosis of the chronic disease. Therefore, the present study aims to evaluate the level of chemokines CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG and CXCL10/IP-10 in serum of chronic carriers of clinical forms: Indeterminate (A=30), mild cardiac (B1= 34) and severe cardiac (C=31) of Chagas' disease, in addition to the negative control group (NEG=20). The assays were performed by Cytometric Beads Array (CBA) using the Human Chemokine kit (BD Biosciences). Data were analyzed using PRISM 6.0 Windows® software. Our results show that chemokine levels are significantly higher when we analyze the entire population of infected individuals compared to the NEG group. In the evaluation of the chemokines CXCL9/MIG and CXCL10/IP-10, we did not observe statistical difference between groups of infected patients. As for CCL2/MCP-1 and CXCL8/IL-8, we found that individuals in group C presented lower levels when compared to individuals in groups A and B1. In addition, individuals in the B1 group had higher levels of CCL5/RANTES concentration when compared to individuals in group C. Suggesting a possible mechanism of regulation of inflammation in individuals with clinical forms A and B1. We observed a moderate positive correlation between CCL2/MCP-1 and %FEVE (left ventricular ejection fraction) in the individuals of group A and C. We conclude that a follow-up study of these patients is necessary for a better understanding of the mechanisms of disease pathogenesis and consequently help us in the search for possible biomarkers of clinical evolution and therapeutic targets.

Key-words: Chagas Disease, Immunopathogenesis, Biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .			
Figura 2 -	Sinais de porta de entrada do Trypanosoma cruzi.	19		
Figura 3 -	Evolução clínica da doença de Chagas humana.			
Figura 4 -	Estrutura das subfamílias de quimiocinas de acordo com o número de resíduos de cisteína.			
Figura 6 -	Esquema da resposta imune no modelo experimental de			
	murino na infecção por doença de Chagas.			
Figura 7 -	Exemplo de aquisição de beads para quimiocinas.			

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - Acquired Immunodeficiency Syndrome

ANVISA - Agência Nacional da Vigilância Sanitária

CBA - Cytometry Bead Array

CCL - "C-C motif ligand" Ligante tipo C-C

CCR - "C-C motif receptor" Receptor tipo C-X-C

CXCL - "C-X-C motif ligand" Ligante tipo C-X-C

CXCR - "C-X-C motif receptor" Receptor tipo C-X-C

ECG - Eletrocardiograma

ELISA - Enzyme-Liked Immunosorbent Assay

FEVE - Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo

HIV - Human Immunodeficiency Virus

IAM - Instituto Aggeu Magalhães

IC - Insuficiência Cardíaca

IFI - Imunoflorescência Indireta

IFN-γ - Interferon gama

IgG - Imunoglobulina isotipo G

iNOS - "Inducible nitric oxid synthase" Óxido nítrico sintase induzível

kDA - KiloDalton

NK - "Natural killer" Matadora Natural

NO - "Oxid nitric" Óxido nítrico

NPT - Núcleo de Plataforma Tecnológica

OMS - Organização Mundial de Saúde

PE - Ficoeritrina

PROCAPE- Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco

RX - Radiografia

TCD4+ - Cluster Diferentiation 4+ (auxiliar)

TCD8+ - Cluster Diferentiation 8+ (citotóxico)

Th - "*T-helper*" Linfócito T auxiliar

TNF - "Tumoral necrosis factor" Fator de necrose tumoral

Treg - Linfócito T regulatório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇAO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Distribuição geográfica e epidemiologia	16
2.2 Ciclo biológico do Trypanosoma cruzi	17
2.3 Manifestações clínicas	18
2.4 Diagnóstico	21
2.5 Tratamento	22
2.6 Imunologia da doença de Chagas	23
2.6.1 QUIMIOCINAS	25
2.6.1.1 Quimiocinas nas formas clínicas da doença de Chagas	28
3 JUSTIFICATIVA	34
4 OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo geral	35
4.2 Objetivos específicos	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 População e local de estudo	36
5.2 Confirmação da sorologia para a infecção pelo Trypanosoma cruzi	37
5.3 Cytometric Bead Array Human Chemokine (CBA BD™)	38
5.3.1 CITÔMETRO DE FLUXO	38
5.4 Análises estatísticas	40
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	41
7 RESULTADOS	42
7.1 Artigo - Quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 detectadas em soro humano de pacientes com a doença de Chagas crônica podem ser marcadores de cardiopatia crônica	43
8 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO A – Parecer de aprovação no CEP	70
ANEXO B – Carta de anuência	71

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, seus vetores naturais são insetos da ordem Hemíptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo o *Triatoma infestans*, o mais importante vetor causador da doença. Em 1909, no estado de Minas Gerais o pesquisador Carlos Chagas (1879-1934) descobriu o *T. cruzi*, com isso, buscou conhecimento em relação aos seus vetores, possíveis reservatórios, manifestações clínicas da doença e sua epidemiologia. Essa descoberta foi considerada única na história da medicina, constituindo um marco importante da ciência e da saúde brasileira (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; RASSI JR; RASSI; DE REZENDE, 2012).

Apesar dos 109 anos de sua descoberta, a doença de Chagas continua sendo considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma das mais importantes doenças infecto-parasitárias relacionadas à pobreza na América Latina, acarretando um importante problema de saúde pública, com uma estimativa de indivíduos infectados no mundo em torno de 8 milhões de pessoas (WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD, 2015). Além disso, tem-se evidenciado o aumento no número de infectados em muitas partes da Europa e do Oeste do Pacífico, ressaltando a expansão da doença para países não endêmicos em virtude dos movimentos migratórios (RASSI JR; RASSI; DE REZENDE, 2012). A transmissão da doença também acontece de forma vertical, oral, por aleitamento materno, acidentes de laboratório, transfusão de sangue ou transplantes de órgãos contaminados (DIAS et al., 2016).

Acredita-se que as manifestações clínicas nas duas fases (aguda e crônica) da doença sejam consequentes de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro (GUTIERREZ et al., 2009). Dentre os fatores relacionados ao parasito, análises em camundongos revelaram que a variabilidade das cepas do *Trypanosoma cruzi*, o tropismo, a antigenicidade e o tamanho do inóculo são aspectos relevantes (ANDRADE et al., 2002). Quanto ao hospedeiro, é importante ressaltar a faixa etária, o estado nutricional e, especialmente, as características imunológicas (DIAS et al., 2016).

A fase crônica da doença de Chagas apresenta três formas clínicas principais: forma indeterminada, forma cardíaca e forma digestiva, tendo a forma cardíaca grande importância médica por apresentar alta morbidade e mortalidade.

Cerca de 20-30% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma cardíaca, caracterizada pela cardiopatia chagásica, e 8-10% apresentam a forma digestiva, caracterizada por vários graus de alterações anatômicas e funcionais do esôfago e/ ou do cólon (DIAS, 1989; SANTOS et al., 2016). Por outro lado, a maioria dos pacientes (cerca de 60-70%) são portadores da forma indeterminada, e não apresentam sinais e sintomas relacionados com o coração e/ou o sistema digestivo. Esses indivíduos ao fim de 10-20 anos de infecção podem evoluir para as formas clínicas sintomáticas descritas acima. A evolução clínica destes indivíduos vem despertando grande interesse entre médicos e pesquisadores visando a busca de marcadores de prognóstico para a forma indeterminada da doença.

No mundo, temos a disponibilidade de duas drogas utilizadas no tratamento da doença de Chagas: o Nifurtimox e o Benzonidazol (BRENER; ANDRADE, 1979; DE CASTRO, 1993). No entanto, o Benzonidazol é a única terapia atualmente disponível, no Brasil, para o tratamento etiológico, que possui ação direta contra as formas tripomastigotas circulantes e amastigota intracelulares, sendo que sua eficácia varia em relação ao tempo de tratamento e dose do medicamento, bem como a fase da doença (MARIN-NETO et al., 2008).

Importantes efeitos colaterais do Benzonidazol têm sido demonstrados, apesar do índice de cura parasitológica ser em torno de 60% nos pacientes que apresentam a fase aguda, por outro lado, a cura parasitológica é pouco expressiva na fase crônica. Pesquisadores estão tentando desenvolver técnicas baseadas na biologia molecular, que são bem mais sensíveis e específicas, para avaliação de cura parasitológica. Atualmente a única forma de avaliação de cura da doença é através da titulação de anticorpos da classe IgG específicos ao parasito, pois eles sofrem uma diminuição, apesar de lenta, ao longo dos anos (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009; SANTOS et al., 2016).

Os mecanismos imunológicos tem grande importância quando se trata da causa de danos tissulares dos indivíduos e sua morbidade, mas a relação dessa resposta imunológica com as formas clínicas sintomáticas ainda é pouco conhecida, devido à complexidade dos mecanismos imunológicos. A ausência de sintomatologia, no caso de indivíduos com a forma indeterminada, pode estar associada com a capacidade individual de regular a resposta imune inflamatória anti-*Trypanosoma cruzi* (DUTRA et al., 2009; DUTRA; GOLLOB, 2008; GOMES et al., 2003).

Estudos têm relatado a importância da resposta imunológica tanto na defesa contra o parasita quanto no processo que causam os danos inflamatórios, demonstrando assim sua possível contribuição na evolução clínica da doença e visando estabelecer uma associação das proteínas inflamatórias solúveis, tais como citocinas e quimiocinas, com as disfunções cardíacas da doença (BRENER; GAZZINELLI, 1997; MELO et al., 2012).

As quimiocinas são importantes mediadores envolvidos na manutenção dos processos inflamatórios por favorecerem a migração de leucócitos ao local de inflamação e na doença de Chagas, as quimiocinas auxiliam a atividade tripanocida dos macrófagos (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014; LANNES-VIEIRA, 2003). Desta forma, níveis elevados de quimiocinas poderiam estar associadas a um mal prognóstico da doença de Chagas crônica. Porém, o papel das quimiocinas na doença de Chagas ou sobre como atuam na evolução clínica da doença ainda não é totalmente conhecida.

Nesse sentido, este estudo propôs a mensuração das quimiocinas (CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10) presentes no soro de portadores da doença de Chagas crônica, na tentativa de contribuir com a elucidação do potencial evolutivo da doença de Chagas. Marcadores biológicos e/ou clínicos e o avanço com estudos de condutas terapêuticas poderiam melhorar qualidade de vida dos doentes já que poderiam predizer a evolução clínica para formas sintomáticas mais graves. Além disso, este estudo ajudará esclarecer a imunopatogênese da doença de Chagas, considerada tão complexa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Distribuição geográfica e epidemiologia

A doença de Chagas está entre uma das mais importantes doenças infecto parasitárias relacionadas à pobreza, com uma estimativa que ainda existam entre 12 e 14 milhões de infectados na América Latina, com mais de 60 milhões de pessoas sob risco de transmissão, em cerca de 18 países endêmicos (DIAS, 2007). Estimase ainda que anualmente ocorrem 41.200 novos casos em países endêmicos e que 14.400 crianças nascem com a doença de Chagas congênita todos os anos (RASSI JR; RASSI; DE REZENDE, 2012), estando em expansão para países não endêmicos em virtude dos movimentos migratórios (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Mais de 120 espécies de triatomíneos foram relatadas na literatura. No entanto, poucos são epidemiologicamente importantes, são especificamente três em particular: *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*, relatados como espécies domiciliares, e *Triatoma dimidiata*, embora pertencente ao habitat silvestre, pode invadir casas e localizar-se no peridomicílio (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O quadro epidemiológico da doença de Chagas no Brasil promoveu mudanças nas ações e estratégias de vigilância, prevenção e controle, por meio da adoção de um novo modelo de vigilância epidemiológica, de acordo com os padrões de transmissão da área geográfica. Detectando a presença e prevenindo a formação de colônias domiciliares do vetor e detectando o surgimento de casos agudos e surtos (DIAS et al., 2016).

A idade da infecção pode variar - em áreas com transmissão domiciliar, as crianças com idade ≤ 5 anos são mais comumente infectadas. Em áreas sem transmissão domiciliar, a infecção é detectada geralmente em adultos ≥25 anos e está relacionada a atividades agrícolas ou de caça que proporcionam maior exposição aos vetores silvestres. Em geral, não há predomínio de gênero na doença de Chagas (WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD, 2015).

2.2 Ciclo biológico do Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi é um parasito flagelado multi-hospedeiro capaz de infectar dezenas de espécies de mamíferos silvestres e domésticos distribuídos em todas as regiões fitogeográficas do Brasil; é encontrado nos mais diversos nichos ecológicos, contribuindo, em cada tipo de ecótopo, para formar modalidades singulares de focos naturais de transmissão (DIAS et al., 2016).

A figura 1 demonstra o ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*, que tem início quando o inseto vetor, triatomíneo, se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado infectado, ingerido as formas tripomastigotas sanguíneos. Esses tripomastigotas, ao chegarem à porção média do intestino do inseto, diferenciam-se para a forma epimastigota, multiplicam-se e ao chegarem na porção posterior do intestino, tornam-se, novamente formas tripomastigotas, mas agora chamado de metacíclico. Esses, por sua vez, serão eliminados junto com as fezes e a urina do inseto ao fazer o repasto sanguíneo. Através de mucosas ou por ferimentos na pele, estes tripomastigotas infectam células do hospedeiro. No interior das células, o parasito ganha forma arredondada, as amastigotas, multiplicando-se por divisão binária. Quando as células estão repletas, eles evoluem para as formas tripomastigotas sanguíneos e com a ruptura da célula hospedeira disseminam-se pela corrente sanguínea, sendo capazes de infectar novos tecidos e órgãos. Se o indivíduo ou animal infectado é picado pelo inseto vetor, os parasitos podem ser transmitidos ao inseto. Fecha-se, assim, o ciclo (BERN, 2015; PALMA, 2017).

Triatomíneo se alimenta de sangue Tripomastigotas se diferenciam e ingere os tripomastigostas em Epimastigostas na porção média do intestino Tripomastigostas entram na corrente sanguínea Estágio no Vetor Epimastigotas de diferenciam em Tripomastigotas no intestino posterior e são excretados nas fezes Amastigotas intracelulares evoluem para Tripomastigotas sanguíneos, causando a ruptura das células hospedeiras Estágio no Homem Tripomastigotas se diferenciam Tripomastigotas para Amastigotas são excretados junto das fezes, e se multiplicam que penetram na pele através de feridas ou mucosas Tripomastigotas invadem células nucleadas

Figura 1 - Ciclo biológico do Trypanosoma cruzi.

Fonte: Bern (2015, tradução nossa)

2.3 Manifestações clínicas

Clinicamente, a doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda seguida de evolução para uma fase crônica, sintomática ou assintomática, com parasitas alojados nos tecidos alvo, especialmente nos músculos do sistema cardíaco e digestivo.

A fase aguda pode durar de um a três meses após a infecção e é caracterizada por uma intensa parasitemia que se inicia após o período de incubação que pode variar de quatro a dez dias, quando a transmissão é vetorial (CHAGAS, 1916; DIAS et al., 2016). A maioria dos casos é assintomática ou oligossintomática com sintomas que incluem dor de cabeça, palidez, dor muscular, dispneia, edema das pernas ou rosto, dor abdominal, tosse, hepatomegalia, erupção cutânea, nódulos dolorosos, esplenomegalia, edema generalizado do corpo, diarreia, adenopatias múltiplas, miocardite, entre outros (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Dependendo de onde o parasita penetra, o primeiro sinal pode ser uma lesão cutânea, também chamada de chagoma de inoculação ou um edema na pálpebra de um dos olhos, o Sinal de Romaña (DIAS, 1997), como mostra a figura 2, é caracterizado histologicamente por um intenso infiltrado de células mononucleares no local da infecção. Curiosamente, essa lesão é persistente, por até 40 dias, com glândulas linfáticas localmente ampliadas e febre de várias semanas (DIAS, 1997; DIAS et al., 2016).



Figura 2 – Sinais de porta de entrada do *Trypanosoma cruzi*

Fonte: Barret et al. (2003).

Legenda: A- Lesão cutânea (chagoma de inoculação); B- Sinal de Romaña.

A doença pode ser mais grave em crianças menores de cinco anos de idade, idosos, pessoas que fazem uso de imunossupressores ou indivíduos infectados com um alto número de parasitas, como ocorre em surtos de origem alimentar (transmissão oral) e em pessoas com HIV/AIDS (CALZADA et al., 2001; DIAS et al., 2016).

Após a fase aguda, os indivíduos evoluem para a fase crônica que pode se apresentar por distintas formas clínicas: a forma indeterminada, que é assintomática, é também a forma mais frequente nos indivíduos infectados, em média de 60% - 70% dos casos; a forma cardíaca, que ocorre em cerca de 20% - 30% dos pacientes, onde ocorrem distúrbios do músculo cardíaco, arritmia, insuficiência cardíaca e embolismos secundários; a forma digestiva, que gera lesões localizadas e o alargamento do esôfago e/ou do cólon, acometendo cerca de 8-10% dos

indivíduos infectados pela doença de Chagas indivíduos, como mostrado na figura 3 (DIAS, 1989; SANTOS et al., 2016), além do mais, existe uma forma mista, que atinge tanto do sistema cardíaco quanto o digestivo com menos de 10% de frequência.

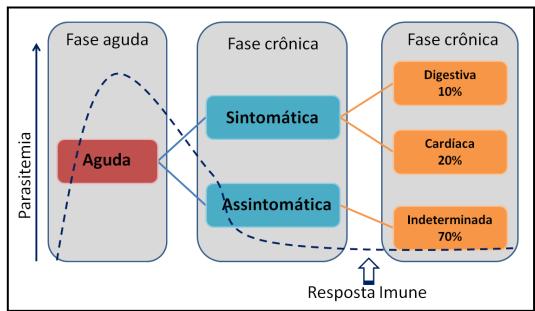


Figura 3 - Evolução clínica da doença de Chagas humana.

Fonte: Adaptado de Dutra et al. (2009, tradução nossa)

A cardiopatia chagásica é forma clínica mais estudada devido aos variados graus de acometimento do coração. De acordo com a I diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011), os indivíduos que desenvolvem a forma crônica podem ser classificados em quatro estágios. No estágio A, estão os pacientes da forma indeterminada, que não apresentam sintomatologia ou pregressos de insuficiência cardíaca (IC) e com eletrocardiograma (ECG) e radiografia (RX) de tórax normais.

No estágio B, estão os pacientes com cardiopatia estrutural que não apresentaram anteriormente nenhum sinal e nem sintoma de IC. Nesse sentido, temos duas situações clínicas: B1 e B2. No estágio B1, estão os pacientes com discretas alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias) e ecocardiográficas (anormalidades da contratilidade regional), porém a função ventricular global é normal. No estágio B2, estão os pacientes que já apresentam disfunção ventricular global, com % de FEVE (fração de ejeção do ventrículo

esquerdo) diminuída. A FEVE, medida em porcentagem, é um avaliador de disfunção contrátil do ventrículo esquerdo, que por sua vez é um fator fisiopatológico como um preditor prognóstico independente. Essa avaliação também pode ser feita através do RX de tórax ou pelo diâmetro ventricular.

No estágio C, estão os pacientes com sintomas graves de IC, e que possuem disfunção ventricular. No estágio D, encontram-se os pacientes com sintomatologia grave de IC, onde se encontram de repouso absoluto, necessitando de intervenções especializadas e intensivas.

O paciente chagásico crônico que desenvolve a forma cardíaca, também exibe uma miocardite difusa, com focos de infiltrado inflamatório e danos às fibras do coração, além de uma fibrose proeminente e escassez de parasitas. Esse infiltrado inflamatório é composto principalmente por células T, exibindo um perfil de citocinas do tipo Th1 e macrófagos (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014). A evolução clínica desses indivíduos pode levar a morte súbita, devido a arritmias e/ou insuficiência cardíaca que muitas vezes ocorre no início da idade adulta (RASSI JR; RASSI; DE REZENDE, 2012; WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD, 2015).

Já os indivíduos que desenvolvem a forma indeterminada, por não apresentarem sintomatologia, acredita-se que haja uma capacidade individual de regulação da resposta imune anti-*T. cruzi* (DUTRA et al., 2009; DUTRA; GOLLOB, 2008; GOMES et al., 2003). Entretanto, devido à complexidade da resposta imunológica na doença de Chagas, esse processo pode também contribuir para os danos inflamatórios causados pela doença, além da possibilidade de evolução clínica da forma assintomática para alguma das formas sintomáticas existentes (BRENER; GAZZINELLI, 1997; LUZ et al., 2013).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico etiológico da doença de Chagas no Brasil deve ser realizado em todos os casos suspeitos, tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Para isso, é fundamental integrar evidências epidemiológicas, clínicas e laboratoriais, na busca de se aumentar o grau de acurácia no diagnóstico (BRASIL, 2014). O diagnóstico complementar da infecção por *Trypanosoma cruzi* por meio de diferentes técnicas laboratoriais deve seguir critérios definidos, a depender da fase da doença (DIAS et al., 2016).

Na fase aguda, o padrão ouro para diagnóstico são os exames parasitológicos, que podem ser diretos ou indiretos, devido à alta quantidade de parasitas circulantes na corrente sanguínea, é possível identificá-los por microscopia óptica. Os exames parasitológicos diretos são: exame direto, gota espessa, estiraço corado, método de *Strout* e microhematócrito; e o método parasitológico indireto, é a hemocultura. Este último pode durar até 3 meses para ter seu resultado liberado, devido a necessidade de condições adequadas de temperatura e meio de cultivo, para o crescimento do parasita.

Para a fase crônica, o II Consenso Brasileiro em doença de Chagas determina que as amostras de soro ou plasma sejam testadas por dois testes imunológicos diferentes. Ambos os testes tendo resultados reagentes, são considerados positivos, ambos com resultados não reagentes, são liberados negativo. Quando os resultados dos testes discordam entre si, temos o resultado inconclusivo. É aconselhado que os testes sejam repetidos, e se caso continue resultado inconclusivo, uma nova coleta de sangue deve ser feita, repetindo o fluxograma de análise. Se confirmado o resultado inconclusivo, a amostra é enviada ao laboratório de referência da região (DIAS et al., 2016).

2.5 Tratamento

Os dois únicos medicamentos utilizados no mundo para o tratamento da doença de Chagas são o Benzonidazol e o Nifurtimox, que são parcialmente eficazes na fase aguda, pois a cura parasitológica depende do tipo de cepa albergada, e consequentemente, diferente níveis de susceptibilidade e resistência natural aos fármacos (ANDRADE; MAGALHAES; PONTES, 1985; DE CASTRO et al., 2011).

O Nirfutimox não é utilizado no Brasil, por ter comprovadamente baixa eficácia nas cepas de *T. cruzi*, que aqui circulam, além disso, o Nifurtimox está contraindicado em pacientes com história de perturbações psiquiátricas ou neurológicas (WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD, 2015). O Benzonidazol é o tratamento de escolha no Brasil, por ser a única terapia atualmente disponível que possui ação direta contra as formas tripomastigotas circulantes e amastigota intracelular, das cepas dessa região. Sua eficácia varia quanto ao tempo de tratamento e a dose do medicamento, bem como a fase que a doença se encontra

(COURA; DE CASTRO, 2002; MARIN-NETO et al., 2008). As principais contraindicações ao tratamento são gravidez e insuficiência renal ou hepática. Essas drogas devem ser administradas por um período de 30 a 60 dias no máximo, por apresentarem graves efeitos colaterais (COURA; DE CASTRO, 2002; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A terapia com Benzonidazol pode atingir taxas de cura de cerca de 60% das crianças infectadas e em pacientes que estão na fase aguda, mas, há baixa expressividade na fase crônica (COURA; DIAS, 2009).

Alguns achados descritos na literatura sobre o efeito terapêutico do Benzonidazol mostram que o tratamento específico durante a fase crônica, diminuiu o aparecimento de novas alterações eletrocardiográficas; promoveu a negativação de 88,8% das hemoculturas durante um período de dois anos, indicando seu efeito tripanocida. Pacientes com manifestações clínicas brandas que utilizaram a medicação tiveram retardamento da evolução da doença de Chagas para as formas crônicas mais graves. Além disso, aqueles pacientes tratados em idades mais jovens aumentam a probabilidade de atingir a cura parasitológica (BERN, 2015; CASTRO; DEMECCA; BARTEL, 2006). Assim, os benefícios do tratamento com Benzonidazol são superiores aos efeitos colaterais, sendo amplamente aceito pelos clínicos.

2.6 Imunologia da doença de Chagas

A resposta imune frente ao *T. cruzi* é bastante complexa, envolvendo o reconhecimento de antígenos do parasita por células apresentadoras de antígenos (APC's) que iniciam a resposta de imunidade inata através de receptores *Toll-like* (TLR) presentes em macrófagos e células dendríticas (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014), além da elevada produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores, como o óxido nítrico (NO) (KAYAMA; TAKEDA, 2010; MARIANO et al., 2008a; MARINO et al., 2003).

Durante a fase aguda da doença de Chagas humana, ocorre a ativação de macrófagos e células *natural killers* (NK), bem como a produção de anticorpos por células plasmáticas. Esses eventos levam ao controle da parasitemia, observados nos estágios tardios da fase aguda e durante a fase crônica. As células NK e os macrófagos produzem citocinas que podem ativar outras células, como linfócitos T

CD4 +, CD8 + e outras subpopulações de células T. A produção da citocina IL-10 e outras moléculas anti-inflamatórias podem influenciar no controle da resposta imune, diminuindo o dano tecidual quando a doença entra na fase crônica. Há muitas evidências que sustentam que a predominância de um ambiente inflamatório durante a fase crônica está associada a formas sintomáticas, enquanto a predominância de um ambiente anti-inflamatório está associada à manutenção da forma indeterminada da doença (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; GUTIERREZ et al., 2007; KAYAMA; TAKEDA, 2010; LANNES-VIEIRA, 2003; LANNES-VIEIRA et al., 2009).

A disseminação do *Trypanosoma cruzi* sistemicamente é acompanhada de uma resposta imune intensa, que permite o controle da parasitemia, mas leva a uma infiltração maciça de células mononucleares no miocárdio (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; GUTIERREZ et al., 2007).

Em resposta a infecção parasitária, é gerada uma reação inflamatória com predominância de células do perfil Th1, protetoras contra o *Trypanosoma cruzi*. Nesse processo é secretado o fator de necrose tumoral (TNF) e IL-12, que estimulam a atividade de células NK e induz a diferenciação de linfócitos T CD4+ e CD8+ e a produção de interferon-γ (IFN-γ), citocina fundamental para a ativação dos macrófagos (KHAN et al., 2016; KOGA et al., 2006; MARIANO et al., 2008b). Por outro lado, ainda na fase aguda há produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e TGF-β, que têm a função de controlar a inflamação e a prevenir os danos secundários nos tecidos. Esses mediadores além de modular negativamente a atividade das células de perfil Th1 e inibir a liberação de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) também têm sido implicados por reduzir o controle da parasitemia intracelular (KAYAMA; TAKEDA, 2010; MARIANO et al., 2008b).

As respostas imunológicas do hospedeiro estão claramente envolvidas nas diferentes manifestações clínicas da doença (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014; DUTRA et al., 2009). Tem sido consolidada a ideia de que a patogenia da agressão miocárdica na fase crônica da doença de Chagas depende principalmente da persistência parasitária e da resposta do sistema imunológico desfavorável a esse estímulo infeccioso intermitente (LAUGIER et al., 2017; MARIN-NETO et al., 2007). Assim, a evolução clínica de indivíduos portadores da forma indeterminada frente às demais formas clínicas sintomáticas representa um dos mais intrigantes processos imunológicos já conhecidos. O portador pode passar sua vida inteira sem o

desenvolvimento de manifestações da patologia chagásica crônica (DUTRA et al., 2014).

Na maioria dos casos, o dano inflamatório predomina e ainda não existe um consenso sobre o papel do equilíbrio dos perfis Th1 e Th2 na resposta imunológica da doença de Chagas. Acredita-se que outras populações de células possam estar envolvidas na homeostase da resposta imune, apesar de serem considerados determinantes para a resistência do hospedeiro (LANNES-VIEIRA, 2003), ao mesmo tempo podem estar relacionados com a patogênese da doença. Sugerindo que um controle bastante equilibrado dessas células deva acontecer para que as respostas não se intensifiquem ou não se perpetuem e consequentemente resultem em proteção em vez de lesão tecidual (DA SILVA, 2016; MARIANO et al., 2008b).

Desta forma, o possível papel dos mecanismos imunes que estejam relacionados com o desenvolvimento das formas clínicas graves da doença de Chagas vem sendo avaliados nas últimas décadas e a busca por biomarcadores de resposta imune celular entre os portadores da doença de Chagas nas diferentes formas clínicas tem sido proposto como ferramenta para avaliação da evolução clínica desses indivíduos, sobretudo dos portadores da forma indeterminada.

Interessantemente, uma família de proteínas muito grande, as chamadas quimiocinas, juntamente com seus receptores, eram desconhecidas há pouco mais de 15 anos. Sua história recente pode ser uma das razões pelas quais ainda entendemos tão pouco sobre os papéis verdadeiros desempenhados pelas quimiocinas na fisiologia normal e de patologia (ROLLINS, 1997).

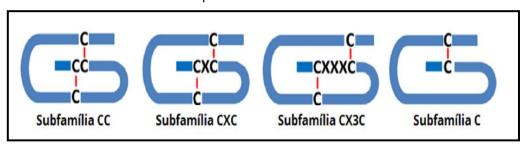
2.6.1 QUIMIOCINAS

Quimiocinas e seus receptores são importantes mediadores da resposta imunológica e possuem papel chave nos processos de permeabilidade vascular, atração, migração e ativação de células imunes, representando importantes alvos de estudos em doenças inflamatórias, como na doença de Chagas (GUTIERREZ et al., 2009; PALOMINO; MARTI, 2015). Elas podem ser produzidas e liberadas por uma grande variedade de tipos celulares em resposta a produtos bacterianos, vírus e agentes que causam danos físicos (KUNKEL; BUTCHER, 2002). Várias condições fisiológicas e patológicas requerem a participação das quimiocinas, incluindo

oncogênese, inflamação, infecção, trauma tecidual, alergia, doenças cardiovasculares, assim como os tumores malignos (SCAPINI et al., 2000).

As quimiocinas compreendem uma grande família de citocinas quimiotáticas estruturalmente homólogas, com aproximadamente 8 a 12 kDa de tamanho. Uma característica é a capacidade de estimular a motilidade (quimiocinese) e os movimentos dirigidos (quimiotaxia) dos leucócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; SCAPINI et al., 2000; SCHARFSTEIN; GOMES; CORREA-OLIVEIRA, 2009). Existem cerca de 50 tipos de quimiocinas, que se dividem em quatro grupos de acordo com a conservação do resíduo de cisteína na extremidade N-terminal. São classificadas em: C-X-C, C-C, C-X₃-C e C, a família C-C, tem suas cisteínas adjacentes, a C-X-C e C-X₃-C, representa um ou três aminoácidos separando as cisteínas, e a família C, possui apenas um par de cisteínas (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011; MACKAY, 2001; SAHINGUR; YEUDALL, 2015), onde a letra X entre essas cisteínas representa um aminoácido qualquer, como apresentado na figura 4.

Figura 4 – Estrutura das subfamílias de quimiocinas de acordo com o número de resíduos de cisteína.



Fonte: Adaptado de Sahingur e Yeudall (2015, tradução nossa).

Quimiocinas CC, também conhecidas como β-quimiocinas, que estimulam principalmente os monócitos, mas também os basófilos, eosinófilos, linfócitos T e as células NK. Quimiocinas CXC, conhecidas como as α-quimiocinas, estimulam principalmente a quimiotaxia de neutrófilos e são essenciais para a ligação de receptores na superfície celular (PALOMINO; MARTI, 2015).

As quimiocinas e seus receptores são capazes de controlar a migração de todas as células imunes. Algumas quimiocinas são consideradas pró-inflamatórias e sua liberação podem ser induzidas durante uma resposta imune em um sítio de infecção, enquanto outras são consideradas homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração celular durante o desenvolvimento ou a manutenção dos

tecidos. A importância fisiológica dessa família de mediadores é resultante de sua especificidade (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011; PALOMINO; MARTI, 2015).

Tais moléculas se ligam às células por meio de Receptores Associados à Proteína G (GPCR), com sete domínios transmembrana (Figura 5), que quando ativados, desencadeiam a cascata de transdução de sinais (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011; ROLLINS, 1997). Cada receptor de quimiocina apresenta uma distinta especificidade para as diferentes quimiocinas (ALLEN; CROWN; HANDEL, 2007).

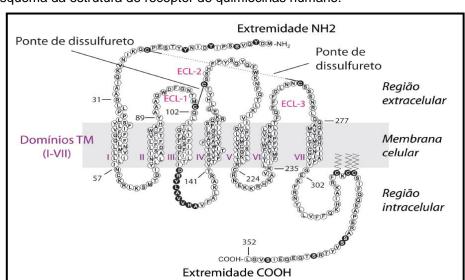


Figura 5 - Esquema da estrutura do receptor de quimiocinas humano.

Fonte: Guerreiro; Santos-Costa; Azevedo-Pereira (2011).

Legenda: TM - região transmembrana (as regiões transmembranares estão assinaladas por numeração romana de I a VII).

O número de quimiocinas conhecidas é muito superior ao número de receptores identificados. Assim, um único receptor pode fazer interação com mais de um tipo de quimiocina diferente. Da mesma forma, uma quimiocina pode se ligar a receptores diferentes, indicando que a redundância e a versatilidade são características do sistema de quimiocinas (BAGGIOLINI, 1998; SCHARFSTEIN; GOMES; CORREA-OLIVEIRA, 2009).

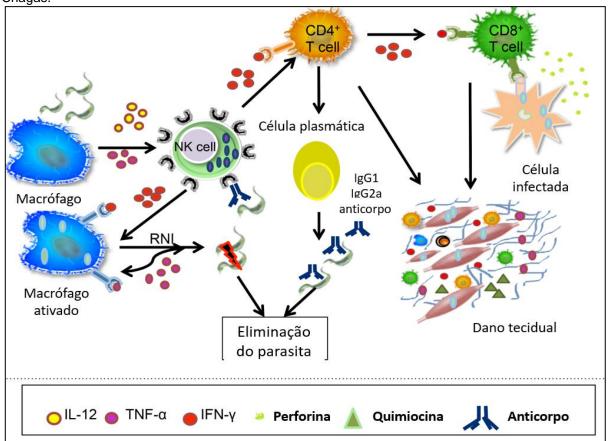
Um estudo de Udoko et al., (2016) mostraram o envolvimento das vias de sinalização molecular, como sendo crítico na patogênese do remodelamento cardíaco através das quimiocinas, em modelo *in vitro* utilizando miócitos cardíacos primários humanos (PHCM). Ressaltando que pequenas alterações de alguns genes

e/ou proteínas de algumas citocinas e quimiocinas envolvidos na patogênese da doença de Chagas, membros de vários sistemas de sinalização, demonstram que uma cascata de eventos proteômicos e complexos transcricionais estão altamente interconectados na infecção por *Trypanosoma cruzi*. Esta cascata de eventos pode induzir uma resposta fibrótica, que progride para a forma cardíaca da doença de Chagas.

2.6.1.1 Quimiocinas nas formas clínicas da doença de Chagas

Após a infecção por *Trypanosoma cruzi*, os parasitas se replicam em muitos tipos de células nucleadas. As células de imunidade inata tais como macrófagos, células dendríticas e células NK fornecem a primeira linha de defesa contra infecção, dando início a resposta imune específica por linfócitos T e B (figura 6). Os antígenos parasitários induzem macrófagos a sintetizar IL-12. Essa citocina inflamatória, juntamente com TNF, desencadeia a ativação de macrófagos e do processo inflamatório, o que controla a replicação parasitária. Ocorre a diferenciação e expansão de células T CD4+ e CD8+ e mecanismos efetores em macrófagos (MARINO et al., 2003). As células T CD4+ estimulam a proliferação das células B e culminando com a produção de anticorpos. A fase aguda também é caracterizada pelo recrutamento de células T aos tecidos, e IFN-γ desempenha um papel importante ao induzir a produção de quimiocinas (TALVANI et al., 2000). Nas primeiras respostas imunes, o ambiente inflamatório é crucial para a resistência do hospedeiro à infecção, mas também pode levar ao início do dano tecidual. Estes eventos imunológicos foram descritos em modelos experimentais, e embora a adaptação para estudos humanos sejam limitados, eles elucidaram muitos aspectos importantes da infecção por Trypanosoma cruzi (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; DUTRA et al., 2014; KAYAMA; TAKEDA, 2010; KOGA et al., 2006).

Figura 6 – Esquema da resposta imune no modelo experimental de murino na infecção por doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de Andrade, Gollob e Dutra (2014, tradução nossa).

Os estudos em modelo murino mostram que as quimiocinas atuam desde o início da infecção promovendo uma resposta de defesa contra o parasito através da eliminação dos parasitas induzida por quimiocina. Monócitos quimioatraídos são responsáveis pela eliminação de tripomastigotas intracelulares por produzir iNOS e significativa produção de NO (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; KHAN et al., 2016; TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002). Desta forma, as quimiocinas são importantes para a eliminação de *Trypanosoma cruzi* na fase aguda da doença.

Por outro lado, embora a mobilização das células imunes sejam essenciais para reduzir a carga parasitária na fase aguda da doença de Chagas, a produção de quimiocinas e a expressão dos seus receptores, induz a migração de células inflamatórias no miocárdio, que atuam como células efetoras de dano cardíaco (CUNHA-NETO et al., 2009; DE MIRANDA et al., 2017; GUTIERREZ et al., 2009).

Na doença de Chagas crônica, há poucos estudos sobre o papel das quimiocinas. A quimiocina CCL5/RANTES, uma das mais estudadas, foi demonstrada por atuar na quimiotaxia de macrófagos e consequentemente no

aumento da fagocitose do parasito e na produção de NO, favorecendo assim a atividade tripanocida por essas células (MARINO et al., 2005). Desta forma, a elevada expressão de CCL5/RANTES poderia induzir migração de células dos perfis de resposta Th1, o que tem sido associado com a inflamação no miocárdio (HARDISON et al., 2006a; LUZ et al., 2013; VILLALTA et al., 1998).

Machado et al., (2005), ao estudar mRNA de CCR5 em camundongos deficientes do receptor CCR5 verificaram que os níveis desse receptor estavam diretamente associados com a infecção pelo *T. cruzi* e que camundongos deficientes deste receptor e infectados, apresentavam níveis menores de células T no coração, além de serem mais susceptíveis à infecção. Desta forma, Machado e colaboradores demonstraram o papel central desta quimiocina e de seus ligantes no controle da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (MARINO et al., 2005).

Calzada et al., (2001), estudando DNA genômico, mostraram que a doença cardíaca é atenuada em pacientes chagásicos com polimorfismo na região promotora do gene de CCR5, sendo a associação ligada a menores níveis de expressão de CCR5 em seus leucócitos, o que leva a uma susceptibilidade de cardiopatia (OLIVEIRA et al., 2014). Sendo as variantes dos genes CCR5 e CCR2, associados à gravidade, mas não com susceptibilidade ao desenvolvimento de cardiopatia chagásica (MACHUCA et al., 2014). Interessantemente, FRADE et al., (2013), viram que em genes de CCL5/RANTES e CCR2 com polimorfismos desempenham um papel na susceptibilidade genética ao desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica.

Cunha-Neto e Chevillard (2014), numa revisão literária que destaca estudos que evidenciam a progressão diferencial de pacientes com doença Chagas para cardiopatia grave, mostraram que na doença de Chagas humana, as quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 e os receptores CCR2, CXCR3 e CCR5 estão diretamente associadas à cardiopatia chagásica crônica severa.

As quimiocinas CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10, podem estar associadas com a evolução clínica da doença para um perfil assintomático (HARDISON et al., 2006b). Porém, visto que essas quimiocinas são induzidas pela citocina IFN- γ (tipo Th1), promovem o recrutamento de linfócitos efetores para os focos inflamatórios, e consequentemente agrava a inflamação cardíaca durante o curso da infecção, sendo assim estariam associadas com a cardiopatia (GOMES et al., 2003; KHAN et al., 2016; LUZ et al., 2013; TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002). Além disso,

Nogueira et al., (2012), viram que polimorfismos em CCR5/RANTES, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 foram associados com a progressão para a forma mais grave de cardiopatia chagásica crônica e que os polimorfismos de CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 também foram associados à intensidade da inflamação do miocárdio e expressão de quimiocinas.

Hardison et al., (2006a), analisando RNA extraído de tecido cardíaco de camundongos infectados pela cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*, demonstraram que as quimiocinas CCL5/RANTES e CXCL10/IP-10, quando associadas estariam ligadas ao aumento da resposta imune frente ao parasita e não apenas com a modulação da resposta cardíaca inflamatória, ou seja, melhora as respostas imunes após a infecção parasitária. No entanto, a análise dessas quimiocinas, CXCL10/IP-10 sozinha ou CCL5/RANTES sozinha, não modula diretamente a resposta inflamatória no coração, sugerindo que outros fatores pró-inflamatórios são necessários para regular a inflamação nestes tecidos em resposta à infecção por *T. cruzi*, e que a CCL5/RANTES apesar de relevante, não é essencial para o controle da infecção por *T. cruzi* em modelo murino (ROFFÊ et al., 2010).

Pouco se sabe sobre o papel da CXCL8/IL-8. PEREIRA et al., (2014), ao avaliar amostras de soro de indivíduos portadores de dislipidemias, verificaram que a CXCL8/IL-8 estava em níveis mais elevados com os pacientes que apresentavam doenças cardiovasculares, sugerindo que esta quimiocina esteja associada com o risco de desenvolvimento da doença cardiovascular. O papel da CXCL8/IL-8 na doença de Chagas não tem sido demonstrada. Desta forma, é necessário entender a sua importância na imunopatogênese das formas clinicas crônicas da doença.

A CCL2/MCP-1, está envolvida no recrutamento de leucócitos para os tecidos afetados pela infecção e no controle da replicação do parasito, além da influência no aumento da atividade fagocitária e produção de NO pelos macrófagos, exercendo papel de proteção na infecção, ou seja, perfil Th2 (DE MIRANDA et al., 2017; PAIVA et al., 2009). Além do mais, ela também pode exercer efeitos na modulação da expressão gênica e proteica, influenciando em vias significativas para o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica, o que gera fibrose e hipertrofia dos cardiomiócitos (CUNHA-NETO et al., 2009; DAMAS et al., 2000; TALVANI et al., 2004a).

Talvani et al., (2004a), num estudo analisando plasma e PBMC, através da técnica de ELISA, obtidos de pacientes com diferentes formas clínicas de cardiopatia

chagásica crônica, observaram um aumento significativo de CCL2/MCP-1 e TNF em indivíduos com cardiopatias moderada e grave quando comparados aos indivíduos não infectados. Diferentemente de KEATING et al., (2015), que observaram baixa produção de CCL2/MCP-1 em indivíduos com a forma mais grave da doença, quando comparado aos indivíduos com formas clínicas mais brandas. A elevação de TNF e CCL2/MCP-1 no plasma, parece ser secundários ao grau de disfunção cardíaca, enquanto que a produção de TNF e CCL2/MCP-1 vistas no PBMC, é secundária não apenas à disfunção cardíaca, mas também a inflamação subjacente no coração de pacientes chagásicos, contradizendo o estudo anterior.

Aliberti et al., (1999), observaram que a expressão e produção de β-quimiocinas como CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CCL4/MIP-1b e CCL5/RANTES, atuam ao induzir a iNOS em macrófagos de PBMC, demonstrando um papel protetor na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, em modelo murino, uma vez que os macrófagos são células efetoras essenciais no controle e eliminação do parasita. Além disso, foi observado que algumas quimiocinas como CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 e CCL5/RANTES, produzidos por macrófagos pró-inflamatórios, permanecem em níveis elevados após a fase aguda e que níveis altos dessas quimiocinas durante a fase crônica estavam associados ao aumento da expressão de IFN-γ e com o grau de inflamação no coração, sugerindo distintos papéis para essas moléculas em ambos os casos, tanto de defesa do hospedeiro como desenvolvimento da imunopatologia da doença de Chagas (HARDISON et al., 2006b; KHAN et al., 2016; RAMASAWMY et al., 2006; TALVANI et al., 2004b).

Segundo Sallusto et al., (1998) e Aliberti et al., (1999), em experimentos *in vitro*, usando modelo humano e murino, respectivamente, viram um aumento significativo de quimiocina CXCL9/MIG e CCL3/MIP-1a e uma diminuição dos níveis de CCL2/MCP-1, após a adição das formas tripomastigotas vivos em cultura. A presença do parasita e de outros mediadores do sistema imunológico incluindo citocinas pode influenciar a expressão dessas quimiocinas. Os autores também demonstraram que a expressão de quimiocinas como CCL3/MIP-1a e CCL2/MCP-1, são indutoras diretas de iNOS em macrófagos e estão envolvidos no controle de parasitemia.

Gomes et al., (2005), numa busca investigativa sobre a expressão de receptores de quimiocinas em portadores da doença de Chagas, através de cultura de PBMC estimuladas com antígenos de *T. cruzi* demonstraram uma expressão

elevada de CCR5 e / ou CCR3 em pacientes com cardiopatia chagásica crônica em comparação com os pacientes que possuíam a forma clínica indeterminada, retomando o conceito de que uma resposta imune exacerbada de tipo Th1 está envolvida na gênese e / ou manutenção da patologia cardíaca na doença de Chagas (DE MIRANDA et al., 2017; GUTIERREZ et al., 2009).

Atualmente, a literatura tem tentado elucidar os processos de inflamação e também de regulação destes mecanismos e uma das estratégias têm sido a investigação do papel das quimiocinas no desenvolvimento da cardiopatia chagásica humana. Porém, os dados ainda são controversos e insuficientes trazendo a constante necessidade de atualização de informações sobre o papel/ação dessas moléculas, e a necessidade de se investigar a relação dessa resposta na imunopatôgenese da doença visando a busca de marcadores de evolução clínica da doença de Chagas crônica.

3 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas faz parte de um grupo de doenças negligenciadas, mundialmente distribuídas e para o qual nenhum medicamento realmente eficaz foi desenvolvido. Além disso, os tratamentos disponíveis apresentam sérias desvantagens, desde elevada toxicidade até ineficácia causada pela resistência adquirida pelo parasita.

Desta maneira, a participação de componentes imunológicos na instalação, desenvolvimento ou manutenção da patogênese chagásica constitui grande importância a ser investigada na busca de possíveis biomarcadores de evolução clínica e alvos terapêuticos para o desenvolvimento de uma nova droga. No entanto, os métodos para tais fins são complexos e morosos por exigirem que estudos de seguimento desses pacientes sejam realizados.

A partir disso, buscamos elucidar a participação das quimiocinas no desenvolvimento da patogênese da doença de chagas crônica, e investigar possíveis biomarcadores de evolução clínica e novos alvos terapêuticos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Elucidar a participação das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 no desenvolvimento da patogênese da doença de chagas crônica, em soro de portadores crônicos das formas clínicas, cardíaca e indeterminada da doença de Chagas.

4.2 Objetivos específicos

- a) Mensurar as quimiocinas (CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10) presentes no soro de portadores e de não portadores da doença de Chagas crônica;
- b) Comparar os níveis das quimiocinas encontrados entre os grupos de indivíduos estudados;
- c) Correlacionar os níveis de quimiocinas encontrados com o % de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (%FEVE).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 População e local de estudo

Foram selecionados 107 indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas, sendo 30 da forma indeterminada (A), 34 da forma cardíaca leve (B1) e 31 da forma cardíaca grave (C), como mostrado na tabela 1. Além de 20 indivíduos não portadores da doença de Chagas (NEG), que foram incluídos no estudo como grupo controle.

Tabela 1: Categorização do grupo de indivíduos portadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Forms Clínica	Idade	Sexo	%FEVE
Forma Clínica	Média/Min - Máx		Média/Min - Máx
A	51.7 / 30 - 72	23 f / 7m	66.9 / 55 - 79
B1	57.8 / 34 - 77	24 f / 10m	63.3 / 55- 75
С	57.9 / 24 - 73	23 f / 8m	40.5 / 25 - 60

Legenda: n (número amostral), A (indeterminado), B1 (cardíacos leves), C (cardíacos graves),f (feminino), m (masculino) e FEVE (fração de ejeção do ventrículo esquerdo). Os valores representados nas colunas de idade e %FEVE são respectivamente e a média entre eles na linha superior e valores mínimos e máximos dos grupos na linha inferior.

Os voluntários portadores foram atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), da Universidade de Pernambuco (UPE), Recife/PE. Essas amostras estão estocadas a -20°C na soroteca do Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC) do IAM/Fiocruz. Atualmente, o ambulatório é o local de referência no estado de Pernambuco para o acompanhamento e tratamento dos pacientes portadores da doença de Chagas.

Para a inclusão desses indivíduos no estudo, foram selecionados alguns critérios, tais como: exames para avaliação clínica (eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de abdômen, sorologia reagente para a infecção chagásica com dois testes com princípios metodológicos diferentes, segundo o Ministério da Saúde (2005), não ter sido submetido ao tratamento etiológico, não apresentar queixas digestivas tais como, disfagia e constipação, não ter apresentado

qualquer alteração leucocitária no hemograma, além de não ter recebido transfusão sanguínea ou transplante de órgãos.

A avaliação dos critérios de inclusão foi realizada em conjunto com médicos colaboradores deste projeto, e foram responsáveis pela caracterização dos pacientes nos estágios de desenvolvimento cardíaco A, B (B1 e B2), C e D, estabelecida pela I Diretriz Latino- Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011) e do II Consenso Brasileiro em doença de Chagas (DIAS et al., 2016). Porém, devido ao "n" insuficiente de indivíduos acometidos com as formas clínicas B2 e D, estes, não fazem parte do presente estudo.

Os pacientes incluídos nesse estudo foram classificados na diretriz como A, B1 e C. Os pacientes classificados com a forma A não apresentam sintomas. Os indivíduos com a forma B1 apresentam alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias), mas não possuem disfunção ventricular. Podendo apresentar ou não, alterações ecocardiográficas discretas (anormalidades de contratilidade discretas), no entanto a função ventricular global é normal. Já os pacientes com a forma clínica C, apresentam sintomas prévios ou atuais de insuficiência cardíaca e possuem disfunção ventricular. Todas as informações acerca dos aspectos clínicos dos pacientes (forma clínica apresentada e presença de co-morbidades) foram registradas no formulário de pesquisa específico, obtidas através dos prontuários dos pacientes e informadas pelos médicos responsáveis.

Os critérios de inclusão para o grupo controle foram: não ter habitado em área endêmica para a doença de Chagas; nunca ter recebido transfusão de sangue; ter apresentado teste sorológico não reagente para a doença de Chagas e não apresentar alteração leucocitária no hemograma. Todas as informações acerca dos indivíduos não portadores foram registradas no formulário de pesquisa específico.

5.2 Confirmação da sorologia para a infecção pelo Trypanosoma cruzi

Foram utilizados dois testes imunoenzimáticos para a confirmação da infecção chagásica com registro ativo na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo um deles o Elisa convencional, kit comercial *Test Elisa Chagas III* (Biochile, Grupo Bio, Santiago, Chile). Onde sua microplaca é sensibilizada com lisado total das cepas de *Trypanosoma cruzi, Tulahuén* e *Mn*, incluindo antígenos de

membrana altamente imunogênicos. E o outro, denominado Elisa recombinante, kit comercial *Imuno-Elisa Wama* (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil), que utiliza antígenos recombinantes purificados.

A metodologia foi realizada conforme orientações dos fabricantes. Os resultados foram interpretados como reagentes quando ambos os testes apresentarem reatividade, e não-reagentes quando ambos não apresentarem reatividade. Amostras que se mantiveram discordantes mesmo após repetição dos testes foram interpretadas com inconclusivas, sendo excluídas da pesquisa.

5.3 Cytometric Bead Array Human Chemokine (CBA BD™)

Os ensaios de CBA ocorrem através de um método de captura de analitos com *beads* de tamanho e fluorescência conhecidos, permitindo a detecção desses analitos através da citometria de fluxo, a técnica foi utilizada para a mensuração quantitativa das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10.

Esta técnica emprega uma mistura de 5 esferas de poliestireno, com diferentes intensidades de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos para as quimiocinas humanas detectadas no canal FL-4. Desta forma, 50 μl da mistura de esferas de captura, marcadas com os anticorpos anti- CCL2/MCP-1, anti-CCL5/RANTES, anti- CXCL8/IL-8, anti- CXCL9/MIG e anti- CXCL10/IP-10 foram adicionadas em tubos devidamente identificados. Em seguida foram adicionados 50 μl do soro e do reagente *Human Chemokine PE Detection* (canal FL2), uma mistura de ficoeritrina (PE) conjugada a anticorpos, em todos os tubos. Após essa etapa as amostras foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, 1 ml da solução tampão (*Wash Buffer*) foi adicionado e os tubos centrifugados a 200 g por 5 min. Descartado o sobrenadante, restou aproximadamente 100 μl em cada tubo, onde foram adicionados 300 μl de solução tampão para resuspender as esferas e realizar a posterior leitura.

5.3.1 CITÔMETRO DE FLUXO

A aquisição e análise das amostras foram realizadas no núcleo de Plataforma Tecnológica (NPT) do IAM/Fiocruz, utilizando o citômetro de fluxo

FACScalibur (BD Biosciences) utilizando o *software* CellQuestPro®. Nele podemos avaliar o tamanho (*Forward Scartter-FSC*) e granulosidade das células (*Side Scartter-SSC*), além da fluorescência tipo 1 (FL1), tipo 2 (FL2), tipo 3 (FL3) e tipo 4 (FL4). Estas características são detectadas utilizando-se de um sistema óptico-eletrônico que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a emissão de fluorescência, dada pelos diferentes fluorocromos, em diferentes comprimentos de onda.

A análise quantitativa das quimiocinas foi realizada em função do deslocamento das microesferas de quimiocinas em gráficos de distribuição pontual nos canais FL2 *versus* FL4, utilizando curvas padrão para cada quimiocina avaliada. Para cada quimiocina foram adquiridos 300 eventos, como recomendado pelo fabricante, assim totalizando 1500 eventos na região R1 (região de fluorescência de *beads*) e cada quimiocina avaliada de acordo o deslocamento e o pico de fluorescência diferencial de sua respectiva *bead* (figura 7).

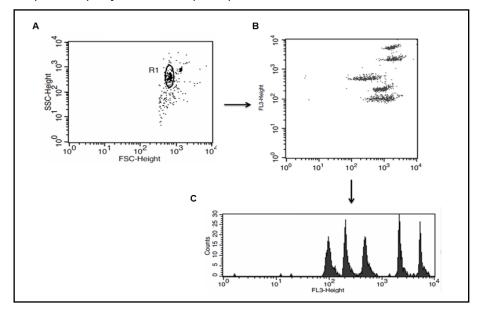


Figura 7 – Exemplo de aquisição de beads para quimiocinas.

Fonte: Adaptado do manual do Kit Human Chemokine (BD™).

Legenda: (A) Gráfico dot plot FSC versus SSC, onde R1 é a marcação realizada para determinar a população de beads; (B) Gráfico de deslocamento diferencial das beads; (C) Gráfico de fluorescência diferencial das beads.

A análise dos dados foi realizada no *software* FCAP 3.1 (BD) acoplado ao computador. As aquisições e análises no citômetro de fluxo obedeceram às Normas de Boas Práticas de Laboratório (BPL) instituídas no IAM/Fiocruz pelo Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde (PDTIS/ Fiocruz).

5.4 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada no software PRISM 6.0 Windows® (E.U.A.). A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de medidas descritivas como: média, mediana e desvio padrão. Para confirmação do pressuposto de normalidade foi utilizado o teste de *D'Agostino e Pearson*. Desta forma, para dados não paramétricos, de distribuição não Gaussiana foi realizada a análise de teste t, seguido do teste *Mann-Whitney*, com o objetivo de comparar a detecção de quimiocinas entre os grupos estudados. Já para a análise de correlação entre as quimiocinas e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (%FEVE), foi aplicado o teste de correlação de *Spearman*. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo possui aprovação junto ao Comitê de Ética do IAM/Fiocruz-PE, por fazer parte de um projeto maior intitulado "Avaliação de marcadores imunológicos em portadores da cardiopatia da doença de Chagas utilizando os antígenos CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*" (ANEXO A), que tem como objetivo a busca de moléculas imunológicos visando a identificação de novos biomarcadores de prognóstico da doença de Chagas. A conduta de inclusão dos indivíduos e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAM/Fiocruz. Todos os indivíduos incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE. A Drª. Yara Gomes, coordenadora do projeto concordou e cedeu as amostras biológicas para utilização no presente projeto de pesquisa (ANEXO B). Os dados que os identificam serão mantidos em absoluto sigilo e, ao invés do nome, o material biológico recebeu um código numérico, mantendo, desta forma, a confidencialidade dos dados.

7 RESULTADOS

Nessa seção, será apresentado o artigo* científico que trás os resultados da pesquisa. Nesse sentido, são problematizadas questões que procuram, a partir dos pressupostos do estudo, dar conta do tema da dissertação, respondendo a seus objetivos.

7.1 Artigo - Quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 detectadas em soro humano de pacientes com a doença de Chagas crônica podem ser marcadores de cardiopatia crônica.

O artigo* avalia os níveis séricos de um grupo de quimiocinas em indivíduos portadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Fazendo também correlações que ajudem a entender a imunopatologia da doença na busca de possíveis biomarcadores de evolução clínica.

^{*}Artigo a ser submetido.

Quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 detectadas em soro humano de pacientes com a doença de Chagas crônica podem ser marcadores de cardiopatia crônica.

Chemokines CCL2 / MCP-1, CCL5 / RANTES and CXCL8 / IL-8 detected in human serum from patients with chronic Chagas' disease may be markers of chronic heart disease.

Michelle da Silva Barros¹, Virginia Maria Barros de Lorena^{1, 2} Clarice Neuenschwander Lins de Morais¹

¹Instituto Aggeu Magalhães - IAM/Fiocruz, Recife, PE, Brasil.

RESUMO

A ação da resposta imunológica na defesa contra o Trypanosoma cruzi têmse mostrado muito importante no processo de evolução das diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas crônica. Sendo as quimiocinas, importantes mediadores envolvidos na manutenção do processo inflamatório, podendo estar associadas a um mal prognóstico da doença crônica. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar o nível das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 em soro de portadores crônicos das formas clínicas: Indeterminada (A=30), Cardíaca leve (B1=34) e Cardíaca grave (C=31) da doença de Chagas, além do grupo controle negativo (NEG=20). Os ensaios foram realizados por Cytometric Beads Array (CBA) utilizando o kit Human Chemokine (BD Biosciences). Os dados foram analisados usando o software PRISM 6.0 Windows®. Nossos resultados mostram que níveis de quimiocinas estão significativamente mais elevados quando analisamos toda a população de indivíduos infectados comparando com o grupo NEG. Na avaliação das quimiocinas CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10, não observamos diferença estatística entre os grupos de pacientes infectados. Quanto à CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8, verificamos que indivíduos do grupo C apresentaram níveis menores quando comparados aos indivíduos dos grupos A e B1. Além disso, indivíduos do grupo B1

²Programa Integrado de Doença de Chagas, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Barros, M. S.

apresentaram maiores níveis de concentração de CCL5/RANTES quando comparados aos indivíduos do grupo C. Sugerindo um possível mecanismo de regulação da inflamação em indivíduos portadores das formas clínicas A e B1. Observamos uma correlação positiva moderada entre CCL2/MCP-1 e %FEVE (fração de ejeção do ventrículo esquerdo) nos indivíduos do grupo A e C. Concluímos que um estudo de seguimento desses pacientes se faz necessário para uma melhor compreensão dos mecanismos da patogênese da doença e consequentemente nos auxiliar na busca de possíveis biomarcadores de evolução clínica e alvos terapêuticos.

Palavras-chaves: Doença de Chagas, Imunopatogênese, Biomarcador.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário hemoflagelado Trypanosoma cruzi, sendo o Triatoma infestans, o mais importante vetor causador da doença. Está entre uma das mais importantes doenças infecto parasitárias relacionadas à pobreza, com uma estimativa que ainda existam entre 12 e 14 milhões de infectados na América Latina, com mais de 60 milhões de pessoas sob risco de transmissão, em cerca de 18 países endêmicos (DIAS, 2007), estando em expansão para países não endêmicos em virtude dos movimentos migratórios (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; RASSI JR; RASSI; DE REZENDE, 2012).

Clinicamente, a doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda, que pode durar de um a três meses após a infecção, seguida de evolução para uma fase crônica, com parasitas alojados nos tecidos alvo, especialmente nos músculos do sistema cardíaco e digestivo (CHAGAS, 1916; DIAS, 1997; DIAS et al., 2016). A fase crônica apresenta três formas clínicas principais: a forma cardíaca, atingindo aproximadamente 20-30% dos casos, a forma digestiva, com 8-10% dos indivíduos infectados e a forma indeterminada, chamada também de assintomática, atingem cerca de 60-70% dos indivíduos (DIAS, 1989; SANTOS et al., 2016). A ausência de sintomatologia pode estar associada com a capacidade individual de regular a resposta imune inflamatória anti-T. cruzi (CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014; DUTRA et al., 2009; DUTRA; GOLLOB, 2008; GOMES et al., 2003; LAUGIER et al., 2017).

Acredita-se que as manifestações clínicas da doença sejam consequentes de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, sendo importante ressaltar neste último, as características imunológicas (ANDRADE et al., 2002; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014; DUTRA et al., 2009). Devido à complexidade dessa resposta imunológica na doença de Chagas, esse processo pode também contribuir para os danos inflamatórios causados pela doença, além da possibilidade de evolução clínica da forma assintomática para alguma das formas sintomáticas existentes (BRENER; GAZZINELLI, 1997; LUZ et al., 2013).

Quimiocinas e seus receptores são importantes mediadores da resposta imunológica e possuem papel chave nos processos de permeabilidade vascular, atração, migração e ativação de células imunes, auxiliando na atividade tripanocida dos macrófagos quimioatraídos produtores de iNOS e significativa produção de NO (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; KHAN et al., 2016; TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002), representando importantes alvos de estudos em doenças inflamatórias, como na doença de Chagas (GUTIERREZ et al., 2009; PALOMINO; MARTI, 2015), pois altas concentrações de quimiocinas numa resposta imune têm sido frequentemente associadas com o mal prognóstico da doença de Chagas cardíaca (FILIPPATOS et al., 2003; TALVANI et al., 2000).

Compreender o papel desempenhado pelas quimiocinas no desenvolvimento da inflamação e durante a resposta imune frente à infecção por *Trypanosoma cruzi* pode contribuir com a elucidação do potencial evolutivo da doença de Chagas, na busca de marcadores biológicos e/ou clínicos e o avanço com estudos de condutas terapêuticas, poderiam melhorar qualidade de vida dos doentes já que poderiam predizer a evolução clínica para formas sintomáticas mais graves. Além disso, conhecer os mecanismos que controlam a migração de células para o tecido cardíaco poderia ajudar no desenvolvimento de alvos terapêuticos que previnam a miocardiopatia, controlando a doença. Assim, nos propomos a avaliar os níveis de quimiocinas em soro de portadores crônicos das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas crônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

População e local de estudo. Foram selecionados 107 indivíduos portadores crônicos da doença de Chagas, através do preenchimento dos seguintes critérios de inclusão: sorologia reagente para a doença de Chagas; não ter sido

submetido ao tratamento etiológico e realização dos exames clínicos para a caracterização das formas clínicas e dos estágios de desenvolvimento cardíaco, estabelecidos pelo II Consenso Brasileiro em doença de Chagas (DIAS et al., 2016) e pela I Diretriz Latino- Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011), respectivamente. Assim foram classificados para o estudo 30 indivíduos portadores da forma indeterminada, denominados A, além de 64 indivíduos classificados portadores da forma cardíaca, sendo divididos em dois subgrupos: B1 (n=34) aqueles indivíduos que apresentavam alterações eletrocardiográficas (distúrbios de condução ou arritmias), mas não possuíam disfunção ventricular e C (n=31) que apresentavam sintomas prévios ou atuais de insuficiência cardíaca e disfunção ventricular. A tabela 1 resume as características gerais dos indivíduos infectados da doença de Chagas.

Um grupo controle negativo (NEG) foi incluído para comparação. Todos os indivíduos deste estudo foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE), da Universidade de Pernambuco (UPE), Recife/PE. Todas as condutas de inclusão dos indivíduos e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CAAE: 0032.0.095.000-10). Todos os indivíduos incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e tiveram uma amostra de sangue coletada para obtenção de soro. As amostras foram estocadas a -20°C até o momento da realização dos experimentos.

Tabela 1: Caracterização do grupo de indivíduos portadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Forma Clínica	Idade	Sexo	%FEVE		
	Média/Min - Máx	Sexu	Média/Min - Máx		
A	51.7 / 30 - 72	23 f / 7m	66.9 / 55 - 79		
B1	57.8 / 34 - 77	24 f / 10m	63.3 / 55- 75		
С	57.9 / 24 - 73	23 f / 8m	40.5 / 25 - 60		

Legenda: n (número amostral), A (indeterminado), B1 (cardíacos leves), C (cardíacos graves), f (feminino), m (masculino) e FEVE (fração de ejeção do ventrículo esquerdo). Os valores representados nas colunas de idade e %FEVE são respectivamente e a média entre eles na linha superior e valores mínimos e máximos dos grupos na linha inferior.

Dosagem de quimiocinas séricas. A mensuração quantitativa das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-

10 foi realizada por *Cytometric Beads Array* (CBA) utilizando o *kit Human Chemokine* (BD Biosciences). Os ensaios de CBA foram realizados seguindo as instruções do fabricante e as aquisições foram realizadas em citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences) utilizando o *software* CellQuestPro®. A análise dos dados foi realizada no *software* FCAP 3.1.

Análises estatísticas. Os dados foram codificados e analisados usando o software gráfico de computador PRISM 6.0 Windows® (*GraphPad*, San Diego, CA). Para confirmação do pressuposto de normalidade foi utilizado o teste de *D'Agostino* e *Pearson*. Desta forma, para dados não paramétricos, de distribuição não Gaussiana foi realizada a análise de teste t, seguido do teste *Mann-Whitney*, com o objetivo de comparar a detecção de quimiocinas entre os grupos estudados. Já para a análise de correlação entre as quimiocinas e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (%FEVE), foi aplicado o teste de correlação de *Spearman*. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Ao avaliarmos a mensuração das quimiocinas CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 (figura 1A e 1B) verificamos uma elevada concentração em todos os grupos de portadores da doença de Chagas quando comparamos ao grupo de indivíduos negativos (NEG). Porém, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes infectados.

Quanto à CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8, verificamos uma maior detecção em todos os grupos de portadores da doença de Chagas quando comparamos o grupo NEG. Além disso, verificamos que indivíduos do grupo C apresentaram níveis menores dessas quimiocinas quando comparados aos indivíduos do grupo A e do grupo B1 (figuras 1C e 1E, respectivamente).

Na análise dos resultados da quimiocina CCL5/RANTES observamos que todos os grupos de portadores da doença de Chagas apresentaram níveis maiores desta quimiocina quando comparados aos indivíduos do grupo NEG. Indivíduos do grupo B1 apresentaram maiores níveis de concentração de CCL5/RANTES quando comparados aos indivíduos do grupo C, como mostrado na figura 1D.

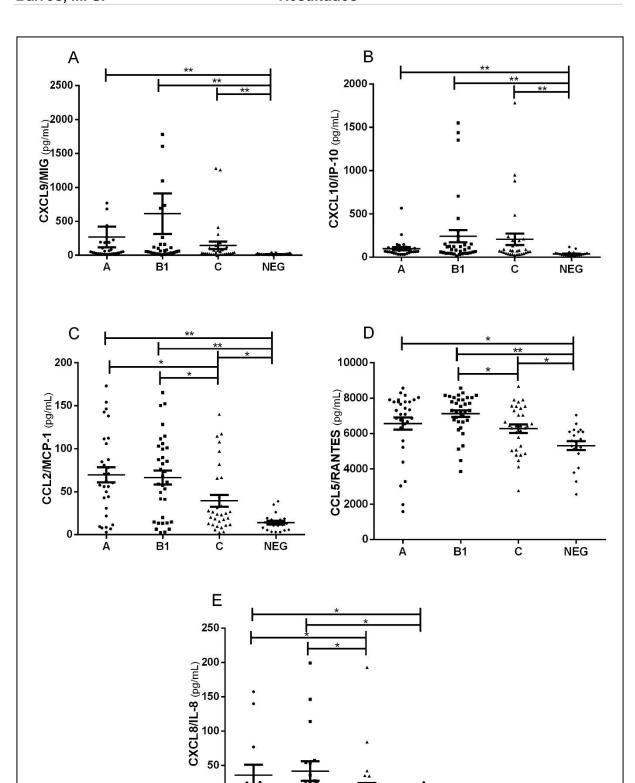


Figura 1: Concentração da quimiocina CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 em soro de pacientes portadores da doença de Chagas. Legenda: Grupos A (n=30), B1 (n=34), C (n=31) e NEG (n=20). As linhas representam valores da mediana em cada grupo e as diferenças estatísticas são indicadas pelas barras sendo representadas por *P<0,05 e **P<0,0001. Fonte: Elaborado pela autora

No intuito de verificar se havia relação entre os níveis de quimiocinas e os graus de disfunção cardíaca realizamos a análise de correlação entre os valores de quimiocinas (em pg/mL) e o %FEVE. Nossos resultados mostraram uma correlação positiva entre CCL2/MCP-1 e %FEVE nos indivíduos do grupo A (r=0,52 e P=0,0032) e C (r=0,41 e P=0,0219). Além disso, uma pequena correlação positiva (r=0,28 e P=0,0045) foi observada entre CCL2/MCP-1 e o %FEVE quando analisamos toda a população de indivíduos infectados, como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Correlação das quimiocinas com o %FEVE por grupo de indivíduos portadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Quimiocina	Forma clínica A		Forma clínica B1		Forma clínica C		Todas	
	r	Р	r	Р	r	Р	r	Р
MCP-1/CCL2	0,52	0,0032	-0,14	0,4249	0,41	0,0219	0,29	0,0045
RANTES/CCL5	0,25	0,1885	-0,01	0,9530	-0,17	0,3609	0,20	0,0572
IL-8/CXCL8	0,10	0,6065	-0,01	0,9410	0,08	0,6610	0,19	0,0665
MIG/CXCL9	-0,04	0,8505	-0,11	0,5540	-0,15	0,4104	0,04	0,6998
IP-10/CXCL10	0,07	0,7033	-0,10	0,5669	-0,24	0,1964	-0,05	0,6461

Legenda: r = rank de Spearman; P = p value

DISCUSSÃO

Os processos pró-inflamatórios frente ao *T. cruzi* mediados por fatores solúveis, como as quimiocinas, são fundamentais na imunopatogênese da doença de Chagas (DUTRA; GOLLOB, 2008; TEIXEIRA; GAZZINELLI; SILVA, 2002). A identificação de quimiocinas envolvidas na miocardiopatia chagásica crônica, poderia auxiliar o desenvolvimento de biomarcadores para diagnóstico precoce e/ou prognóstico em portadores das formas mais brandas da doença. No presente estudo, avaliamos as quimiocinas presentes no soro de indivíduos que possuem diferentes formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

Nossos resultados mostraram níveis mais altos das quimiocinas CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 em pacientes com a doença de Chagas quando comparado com ao grupo de indivíduos não infectados. Essas quimiocinas têm sido demonstradas por serem fundamentais no controle da parasitemia em modelo experimental, contudo, agravam a inflamação cardíaca durante o curso da infecção (BAGGIOLINI, 1998).

Porém, em hospedeiros humanos, a CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 não há um consenso sobre o papel destas quimiocinas no desenvolvimento da cardiopatia chagásica. Níveis elevados de CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 e de CCL2/MCP-1

foram mostrados em plasma de indivíduos portadores de cardiomegalia quando comparados aos indivíduos da forma indeterminada (SOUSA et al., 2014). Além disso, a análise de correlação mostrou que a maior produção dessas quimiocinas estava associada à piora da função cardíaca, conforme determinado pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo e pelo diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (SOUSA et al., 2014), apontando essas quimiocinas como biomarcadores da cardiomegalia da doença de Chagas. LUZ et al., (2013) viram níveis significativamente maiores de CXCL10/IP-10 em indivíduos crônicos em relação ao grupo de indivíduos sem infecção, mas também observaram um aumento estatisticamente significativo dos níveis dessa quimiocina quando observado indivíduos com a forma cardíaca quando comparado aos da forma indeterminada. Porém, polimorfismo nos genes de CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 foram associados à diminuição de risco de desenvolvimento de cardiopatia, onde foram comparados indivíduos com cardiopatia sem infecção chagásica e cardiopatas chagásicos crônicos graves ((NOGUEIRA et al., 2012).

Em nosso estudo, verificamos que indivíduos portadores da cardiopatia grave apresentaram níveis menores de CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 quando comparados aos indivíduos com cardiopatia leve e assintomáticos. Além disso, verificamos correlação positiva entre fração de ejeção do ventrículo esquerdo (%FEVE) e níveis de CCL2/MCP-1, em indivíduos portadores da forma indeterminada, bem como, em portadores da forma cardíaca grave indicando uma relação direta entre os níveis de CCL2/MCP-1 e a função cardíaca. Ratificando esse achados, observamos esta correlação também quando analisamos todos os indivíduos do estudo.

A produção das quimiocinas CCL2/MCP-1e CCL5/RANTES na fase aguda da doença de Chagas, em modelo experimental, têm sido demonstradas por induzir a isoforma da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em macrófagos (ALIBERTI et al., 1999; MACHADO et al., 2000) sendo essenciais no controle e eliminação do parasita. Por outro lado, essas quimiocinas permanecem elevadas após a fase aguda e estão correlacionadas positivamente com os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IFN-γ e TNF em cardiomiócitos, sugerindo uma forte participação no desenvolvimento de inflamação e consequentemente danos cardíacos pelo recrutamento de células citototóxicas quimioatraídas por esses fatores solúveis (HARDISON et al., 2006a, 2006b; TALVANI et al., 2000).

Em humanos, poucos estudos foram realizados detectando quimiocinas em soro ou plasma como no nosso estudo. Altos níveis de CCL2/MCP-1 foram verificados em plasma de portadores de cardiopatia chagásica grave, quando compararam àqueles com cardiopatia leve (TALVANI et al., 2004a). SOUSA et al., (2014), detectaram níveis mais elevados de CCL2/MCP-1 em portadores da forma cardíaca "dilatada", ou seja, portadores de cardiomegalia, quando compararam aos indivíduos portadores da forma indeterminada. Além disso, Ramasawmy et al., (2006) analisando a correlação da quimiocina CCL2/MCP-1 com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, não verificaram diferença significativa nos grupos de indivíduos cardíacos e isso também não ocorreu no grupo de assintomático, sugerindo que CCL2/MCP-1 não tem nenhuma influência no %FEVE. Discordando dos nossos achados, pois observamos uma correlação positiva entre CCL2/MCP-1 e %FEVE nos indivíduos do grupo de indivíduos indeterminados e cardíacos graves. Por outro lado, concordando com nossos achados, Keating et al., (2015) mostraram baixos níveis de CCL2/MCP-1 em indivíduos com a forma mais grave da doença, quando comparado aos indivíduos com as formas clínicas mais brandas da doença.

Quanto à CCL5/RANTES, a elevada expressão desta quimiocina, e de seu principal receptor (CCR5) têm sido implicados pela migração de células dos perfis de resposta do tipo Th1, o que tem sido associado com a inflamação no miocárdio, por atuar na quimiotaxia de macrófagos e consequentemente no aumento da fagocitose do parasito e produção de NO, favorecendo assim a atividade tripanocida por essas células, mas também com alto grau de dano tecidual no coração (GOMES et al., 2005; HARDISON et al., 2006a; LUZ et al., 2013; MARINO et al., 2005; VILLALTA et al., 1998). Desta forma, em nosso estudo, esperávamos encontrar níveis mais elevados de CCL5/RANTES no soro de portadores de cardiopatia crônica grave. Porém, estes indivíduos apresentaram níveis menores desta quimiocinas. Talvani et al., (2004b) viram que pacientes com cardiopatia leve apresentaram elevada expressão de CCR5 comparados com indivíduos não infectados ou com cardiopatia grave. Os autores sugerem que indivíduos com cardiopatia grave não controlam adequadamente a infecção e são assim propensas a desenvolver uma infecção crônica mais grave, o que nos faz pensar que nossos resultados estão concordando com este estudo. No entanto, não há nenhuma comprovação de que a doença aguda mais grave seja seguida por um maior risco de desenvolver doença crônica grave. Sugere-se que CCL5/RANTES e o CCR5 sejam essenciais para o hospedeiro

montar uma resposta imune protetora contra o parasita e que a expressão de CCR5 mais baixo em pacientes com doença mais grave poderia ser devido à presença de disfunção cardíaca neste grupo (MACHUCA et al., 2014; TALVANI et al., 2004b). Curiosamente Roffê et al., (2010), apontam que CCL5/RANTES apesar de relevante, não é essencial para o controle da infecção por *T. cruzi*, em modelo murino. Já em outro estudo, níveis de CCL5/RANTES foram semelhantes entre portadores da forma indeterminada e cardíaca (SOUSA et al., 2014).

Há poucos achados na literatura sobre o papel da CXCL8/IL-8. Pereira et al., (2014), observaram níveis mais elevados dessa quimiocina em soro de paciente com dislipidemia que apresentavam doenças cardiovasculares, sugerindo que esta quimiocina esteja associada com o risco de desenvolvimento da doença cardiovascular. Contraditoriamente a esse achado, não vimos uma diferença estatisticamente significativa da CXCL8/IL-8 entre os indivíduos da forma cardíaca grave quando comparados ao grupo NEG. Porém, a CXCL8/IL-8 deve possuir forte papel na regulação da resposta anti- T. cruzi, visto que portadores das formas clínicas mais brandas da doença possuem níveis maiores desta quimiocina, quando comparados aos portadores da forma cardíaca grave. Isso reforça a necessidade de entender a importância dessa quimiocina na imunopatogênese da doença de Chagas.

Nosso trabalho é pioneiro por mensurar quimiocinas séricas em um moderado número de pacientes, categorizados em grupos de indivíduos utilizando a associação da classificação do II Consenso de doença de Chagas (DIAS et al., 2016) e da I Diretriz Latino- Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011). Interessantemente, diferentes cepas de T. cruzi podem possuir funções na modulação de parâmetros pró-inflamatórios como a expressão de quimiocinas e de seus receptores, tendo assim influência na resposta imune do hospedeiro e consequentemente no desenvolvimento das apresentações clinicas da doença (ARAÚJO, 2017), entretanto, o exato papel das quimiocinas na doença de Chagas ainda permanece em discussão.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que haja um aumento de produção de quimiocinas em pacientes com as formas clínicas mais brandas da doença de

Chagas, sugerindo a possível participação do sistema de quimiocinas no controle da morbidade da infecção chagásica e a relevância da remodelação induzida pela cardiomegalia e/ou insuficiência cardíaca na modificação de parâmetros imunes dos indivíduos infectados. Sabemos que a compreensão do controle biológico do tráfego leucocitário em resposta a infecção pelo *T. cruzi* pode embasar novos tratamentos que não prejudiquem o controle parasitário (LANNES-VIEIRA et al., 2009). Assim, o entendimento da expressão diferencial das quimiocinas e de seus receptores nas formas clínicas da doença pode ser uma alternativa útil no campo da aplicação de novas estratégias terapêuticas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (Universal/CNPq 474926/2012-5) e Programa de Excelência em Pesquisa da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Proep-Facepe APQ-1703-2.11/15). Agradecemos Sr. Mineo Nakazawa pelo apoio técnico, e a Drª Yara Gomes do departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães — IAM/Fiocruz, por ceder às amostras de soro. Agradecemos ainda ao Instituto Aggeu Magalhães por disponibilizar toda infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Conflito de Interesse. Não há qualquer conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ALIBERTI, J. C. S. et al. β-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with Trypanosoma cruzi. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 9, p. 4819–4826, 1999.

ALLEN, S. J.; CROWN, S. E.; HANDEL, T. M. Chemokine:Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 25, p. 787–820, 2007.

ANDRADE, L. O. et al. Trypanosoma cruzi: Role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, New York, v.100, n. 4, p. 269-275, 2002.

- ANDRADE, S. G.; MAGALHAES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with Trypanosoma cruzi strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 63, n. 4, p. 721, 1985.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014. Disponível em: https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003010>. Acesso em: 28 Set. 2016.
- ARAÚJO, N. L. S. de. Caracterização do padrão de quimiocinas em diferentes formas clinicas da doença de Chagas. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, London, v. 392, n. 6676, p. 565, 1998.
- BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiases. **The Lancet**, London, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
- BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine,** Boston, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Koogan, 1979.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immnunological Control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International archives of allergy and immunology,** Basel, v.114, n. 2, p. 103-110, 1997.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO (Brasil). Brasília: **Ministério da Saúde**, v. 46, n.21, 2015.
- CALZADA, J. E. et al. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. **Tissue antigens**, Copenhagen, v. 58, n. 3, p. 154–158, 2001.
- CASTRO, J. A.; DEMECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & experimental toxicology,** Basingstoke, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.
- CHAGAS, C. Tripanosomiase americana: forma aguda da molestia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 37–60, 1916.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease -100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 104, p. 31–40, 2009.
- CUNHA-NETO, E. et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 252–258, 2009.
- CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 2014, 2014. Disponível em: https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/683230/ >. Acesso em: 28 Set. 2016.
- DA SILVA, L. D. M. **Papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de citocinas em pacientes chagásicos crônicos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Junior, Botucatu, 2016.
- DAMAS, J. K. et al. Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 4, p. 778–787, 2000.
- DE CASTRO, S. L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against Trypanosoma cruzi. **Acta Tropica**, Basel, v. 53, n. 2, p. 83-98, 1993.
- DE CASTRO, S. L. et al. Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential *Trypanosoma cruzi* Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. **Molecular Biology** International, New York, v. 2011, 2011. Disponível em: < https://www.hindawi.com/journals/mbi/2011/306928/ >. Acesso em: 28 Set. 2016.
- DE MIRANDA, M. B. et al. Ex vivo T-lymphocyte chemokine receptor phenotypes in patients with chronic Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** Brasília, v. 50, n. 5, p. 689–692, 2017.
- DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 147-156, 1989.
- DIAS, J. C. P. Cecílio Romaña,o sinal de romaña e a doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 407–413, 1997.
- DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. S13–S22, 2007.
- DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. especial, p 7-86, 2016.

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

DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 377–387, 2014.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current opinion in infectious diseases**, London, v. 21, n. 3, p. 287-292, 2008. Disponível em:

< https://journals.lww.com/co-

infectiousdiseases/Fulltext/2008/06000/Current_concepts_in_immunoregulation_and _pathology.12.aspx>. Acesso em: 28 Set. 2016.

FILIPPATOS, G. et al. Chemokines in Cardiovascular Remodeling: Clinical and Therapeutic Implications. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 3, n. 2, p. 139–147, 2003.

FRADE, A. F. et al. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: Involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 1. p. 587–604, 2013.

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

GOMES, J. A. S. et al. Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas' Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n. 12, p. 7960–7966, 2005. Disponível em: https://iai.asm.org/content/73/12/7960>. Acesso em: 28 Set. 2016.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: What has been achieved? what remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 115-121, 2009.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores: Características e funções fisiológicas. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 24, n. 4, p. 967–976, 2011.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. Effector Mechanisms of Macrophages Infected with Trypanosoma cruzi. In: DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. **Protozoans in Macrophages.** 1.ed. New York: Taylor & Francis Group, 2007. cap.16, p. 207-220.

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

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

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

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. **Microbes and Infection**, Paris, v. 12, p. 511–517, 2010.

KEATING, S. M. et al. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 199, p. 451–459, 2015.

KHAN, A. et al. Role of Monokine Induced by Interferon Gamma in Discrimination and Prognosis of Patients With Chagas' Disease and Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. **Journal of cardiovascular pharmacology**, New York, v. 67, n. 5, p. 427–432, 2016.

KOGA, R. et al. TLR-Dependent Induction of IFN-b Mediates Host Defense against Trypanosoma cruzi. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 177, n. 10, p. 7059–7066, 2006.

KUNKEL, E. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. **Immunity**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 1–4, 2002.

LANNES-VIEIRA, J. Trypanosoma cruzi-elicited CD8+ T Cell-mediated Myocarditis: Chemokine Receptors and Adhesion Molecules as Potential Therapeutic Targets to Control Chronic Inflammation? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 299–304, 2003.

LANNES-VIEIRA, J. et al. Chronic Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy: From the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 226–235, 2009.

LAUGIER, L. et al. Whole-Genome Cardiac DNA Methylation Fingerprint and Gene Expression Analysis Provide New Insights in the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 65, n. 7, p. 1103-1111, 2017.

LUZ, P. R. et al. Association of IP-10 and PDGF-BB levels with clinical forms of chronic Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 169, n.4, p. 53–55, 2013.

MACHADO, F. S. et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, Dallas, v. 102, n. 24, p. 3003-3008, 2000.

MACHADO, F. S. et al. CCR5 Plays a Critical Role in the Development of Myocarditis and Host Protection in Mice Infected with Trypanosoma cruzi. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 191, n. 4, p. 627–636, 2005.

MACHUCA, M. A. et al. SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. **Human Immunology,** New York, v. 75, n. 12, p. 1210–1215, 2014.

MACKAY, C. R. Chemokines: Immunology's high impact factors. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 2, p. 95-101, 2001.

MARIANO, F. S. et al. The involvement of CD4+ CD25+ T cells in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10, n. 7, p. 825–833, 2008.

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

MARIN-NETO, J. A. et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **American Heart Journal**, Saint Louis, v. 156, n. 1, p. 37-43, 2008.

MARINO, A. P. M. P. et al. Trypanosoma cruzi infection: A continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 36, n. 8, p. 1121–1133, 2003.

MARINO, A. P. M. P. et al. CC-chemokine receptors: A potential therapeutic target for Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 93–96, 2005.

MELO, A. S. DE et al. IL-10 and IFN-γ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of Trypanosoma cruzi. **Cytokine,** Philadelphia, v. 58, n. 2, p. 207–212, 2012.

NOGUEIRA, L. G. et al. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. e1867, 2012. Disponível em:

< https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001867 >. Acesso em: 28 Set. 2016.

OLIVEIRA, A. P. et al. CCR5 chemokine receptor gene variants in chronic Chagas' disease. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 176, n. 2, p. 520–522, 2014.

PAIVA, C. N. et al. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute Trypanosoma cruzi infection. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 86, n. 5, p. 1239–1246, 2009.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PEREIRA, M. M. et al. Serum levels of cytokines and chemokines associated with cardiovascular disease in Brazilian patients treated with statins for dyslipidemia. **International Immunopharmacology,** Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 66–70, 2014.

RAMASAWMY, R. et al. The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human chagas disease. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 43, n. 3, p. 305–311, 2006.

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

RASSI JR, A.; RASSI, A.; DE REZENDE, J. M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America,** Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

ROFFÊ, E. et al. Role of CCL3/MIP-1α and CCL5/RANTES during acute Trypanosoma cruzi infection in rats. **Microbes and Infection,** Paris, v. 12, n. 8–9, p. 669–676, 2010.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, New York, v. 90, n. 3, p. 909–928, 1997.

SAHINGUR, S. E.; YEUDALL, W. A. Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 6, n. 214, 2015.

SALLUSTO, F. et al. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 187, n. 6, p. 875-883, 1998.

SANTOS, F. L. N. et al. Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 94, n. 5, p. 1034–1039, 2016.

SCAPINI, P. et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews,** Copenhagen, v. 177, n. 1, p. 195–203, 2000.

SCHARFSTEIN, J.; GOMES, J. DE A. S.; CORREA-OLIVEIRA, R. Back to the future in Chagas disease: From animal models to patient cohort studies, progress in immunopathogenesis research. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 187–198, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 97, n. 2, p. 6 - 8, 2011.

SOUSA, G. et al. Plasma chemokine as potential biomarker of cardiac morbidity in Chagas disease (HUM8P.330). **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 192, n. 1, 2014.

TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: Tissue parasitism and endogenous IFN-γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with Trypanosoma cruzi. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 8, p. 851–866, 2000.

TALVANI, A. et al. Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor—a in Chagasic Cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 38, n. 7, p. 943–950, 2004a.

TALVANI, A. et al. Chemokine Receptor Expression on the Surface of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Chagas Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n. 2, p. 214–220, 2004b.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 262-265, 2002.

TORTORA, G. G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UDOKO, A. N. et al. Early Regulation of Profibrotic Genes in Primary Human Cardiac Myocytes by Trypanosoma cruzi. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 1-23, 2016. Disponível em: https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003747>. Acesso em: 28 Set. 2016.

VILLALTA, F. et al. The Cysteine-Cysteine Family of Chemokines RANTES, MIP-1a, and MIP-1b Induce Trypanocidal Activity in Human Macrophages via Nitric Oxide. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4690–4695, 1998.

WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD. **World Health Organization**. Geneva, v. 90, n.6, p. 33-44, 2015.

8 CONCLUSÃO

Em nosso estudo verificamos que as quimiocinas estão em maiores níveis em portadores da doença de Chagas crônica. Por outro lado, verificamos que houve níveis mais elevados de CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES e CXCL8/IL-8 em pacientes com as formas clínicas mais brandas (forma cardíaca leve e forma indeterminada) da doença de Chagas quando comparamos aos indivíduos com cardiopatia grave. Assim, sugerimos que exista uma importante participação do sistema de quimiocinas no controle da morbidade infecção chagásica, havendo um relevante remodelamento induzido pela cardiomegalia e/ou insuficiência cardíaca, modificando os parâmetros imunes dos indivíduos infectados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ALIBERTI, J. C. S. et al. β-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with Trypanosoma cruzi. **Infection and Immunity,** Washington, v. 67, n. 9, p. 4819–4826, 1999.
- ALLEN, S. J.; CROWN, S. E.; HANDEL, T. M. Chemokine:Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 25, p. 787–820, 2007.
- ANDRADE, L. O. et al. Trypanosoma cruzi: Role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, New York, v.100, n. 4, p. 269-275, 2002.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHAES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with Trypanosoma cruzi strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 63, n. 4, p. 721, 1985.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014. Disponível em: https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003010>. Acesso em: 28 Set. 2016.
- ARAÚJO, N. L. S. de. Caracterização do padrão de quimiocinas em diferentes formas clinicas da doença de Chagas. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, London, v. 392, n. 6676, p. 565, 1998.
- BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiases. **The Lancet**, London, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
- BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Koogan, 1979.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immnunological Control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International archives of allergy and immunology**, Basel, v.114, n. 2, p. 103-110, 1997.

- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO (Brasil). Brasília: **Ministério da Saúde**, v. 46, n.21, 2015.
- CALZADA, J. E. et al. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. **Tissue antigens**, Copenhagen, v. 58, n. 3, p. 154–158, 2001.
- CASTRO, J. A.; DEMECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & experimental toxicology,** Basingstoke, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006.
- CHAGAS, C. Tripanosomiase americana: forma aguda da molestia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 37–60, 1916.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease -100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 104, p. 31–40, 2009.
- CUNHA-NETO, E. et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 252–258, 2009.
- CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 2014, 2014. Disponível em: https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/683230/ >. Acesso em: 28 Set. 2016.
- DA SILVA, L. D. M. **Papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de citocinas em pacientes chagásicos crônicos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Junior, Botucatu, 2016.
- DAMAS, J. K. et al. Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 4, p. 778–787, 2000.
- DE CASTRO, S. L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against Trypanosoma cruzi. **Acta Tropica**, Basel, v. 53, n. 2, p. 83-98, 1993.
- DE CASTRO, S. L. et al. Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential *Trypanosoma cruzi* Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. **Molecular Biology International**, New York, v. 2011, 2011. Disponível em:
- < https://www.hindawi.com/journals/mbi/2011/306928/ >. Acesso em: 28 Set. 2016.

- DE MIRANDA, M. B. et al. Ex vivo T-lymphocyte chemokine receptor phenotypes in patients with chronic Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** Brasília, v. 50, n. 5, p. 689–692, 2017.
- DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 147-156, 1989.
- DIAS, J. C. P. Cecílio Romaña, o sinal de romaña e a doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 407–413, 1997.
- DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. S13–S22, 2007.
- DIAS, J. C. P. et al. Il Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. especial, p 7-86, 2016.
- DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 208–218, 2009.
- DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 377–387, 2014.
- DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current opinion in infectious diseases**, London, v. 21, n. 3, p. 287-292, 2008. Disponível em:
- < https://journals.lww.com/co-
- infectiousdiseases/Fulltext/2008/06000/Current_concepts_in_immunoregulation_and _pathology.12.aspx>. Acesso em: 28 Set. 2016.
- FILIPPATOS, G. et al. Chemokines in Cardiovascular Remodeling: Clinical and Therapeutic Implications. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 3, n. 2, p. 139–147, 2003.
- FRADE, A. F. et al. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: Involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 1. p. 587–604, 2013.
- GOMES, J. A. S. et al. Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, 2003.
- GOMES, J. A. S. et al. Type 1 Chemokine Receptor Expression in Chagas' Disease Correlates with Morbidity in Cardiac Patients. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 73, n. 12, p. 7960–7966, 2005. Disponível em:
- https://iai.asm.org/content/73/12/7960>. Acesso em: 28 Set. 2016.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: What has been achieved? what remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 115-121, 2009.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores: Características e funções fisiológicas. **Acta Medica Portuguesa**, Lisboa, v. 24, n. 4, p. 967–976, 2011.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. Effector Mechanisms of Macrophages Infected with Trypanosoma cruzi. In: DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. **Protozoans in Macrophages.** 1.ed. New York: Taylor & Francis Group, 2007. cap.16, p. 207-220.

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

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

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

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. **Microbes and Infection**, Paris, v. 12, p. 511–517, 2010.

KEATING, S. M. et al. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 199, p. 451–459, 2015.

KHAN, A. et al. Role of Monokine Induced by Interferon Gamma in Discrimination and Prognosis of Patients With Chagas' Disease and Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. **Journal of cardiovascular pharmacology**, New York, v. 67, n. 5, p. 427–432, 2016.

KOGA, R. et al. TLR-Dependent Induction of IFN-b Mediates Host Defense against Trypanosoma cruzi. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 177, n. 10, p. 7059–7066, 2006.

KUNKEL, E. J.; BUTCHER, E. C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. **Immunity**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 1–4, 2002.

LANNES-VIEIRA, J. Trypanosoma cruzi-elicited CD8+ T Cell-mediated Myocarditis: Chemokine Receptors and Adhesion Molecules as Potential Therapeutic Targets to Control Chronic Inflammation? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 299–304, 2003.

LANNES-VIEIRA, J. et al. Chronic Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy: From the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 226–235, 2009.

LAUGIER, L. et al. Whole-Genome Cardiac DNA Methylation Fingerprint and Gene Expression Analysis Provide New Insights in the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 65, n. 7, p. 1103-1111, 2017.

LUZ, P. R. et al. Association of IP-10 and PDGF-BB levels with clinical forms of chronic Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 169, n.4, p. 53–55, 2013.

MACHADO, F. S. et al. Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, Dallas, v. 102, n. 24, p. 3003-3008, 2000.

MACHADO, F. S. et al. CCR5 Plays a Critical Role in the Development of Myocarditis and Host Protection in Mice Infected with Trypanosoma cruzi. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 191, n. 4, p. 627–636, 2005.

MACHUCA, M. A. et al. SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. **Human Immunology,** New York, v. 75, n. 12, p. 1210–1215, 2014.

MACKAY, C. R. Chemokines: Immunology's high impact factors. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 2, p. 95-101, 2001.

MARIANO, F. S. et al. The involvement of CD4+ CD25+ T cells in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10, n. 7, p. 825–833, 2008.

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

MARIN-NETO, J. A. et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **American Heart Journal**, Saint Louis, v. 156, n. 1, p. 37-43, 2008.

MARINO, A. P. M. P. et al. Trypanosoma cruzi infection: A continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 36, n. 8, p. 1121–1133, 2003.

MARINO, A. P. M. P. et al. CC-chemokine receptors: A potential therapeutic target for Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 93–96, 2005.

MELO, A. S. DE et al. IL-10 and IFN- γ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of Trypanosoma cruzi. **Cytokine**, Philadelphia, v. 58, n. 2, p. 207–212, 2012.

NOGUEIRA, L. G. et al. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. e1867, 2012. Disponível em:

< https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001867 >. Acesso em: 28 Set. 2016.

OLIVEIRA, A. P. et al. CCR5 chemokine receptor gene variants in chronic Chagas' disease. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 176, n. 2, p. 520–522, 2014.

PAIVA, C. N. et al. CCL2/MCP-1 controls parasite burden, cell infiltration, and mononuclear activation during acute Trypanosoma cruzi infection. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 86, n. 5, p. 1239–1246, 2009.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PEREIRA, M. M. et al. Serum levels of cytokines and chemokines associated with cardiovascular disease in Brazilian patients treated with statins for dyslipidemia. **International Immunopharmacology,** Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 66–70, 2014.

RAMASAWMY, R. et al. The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human chagas disease. **Clinical infectious diseases,** Chicago, v. 43, n. 3, p. 305–311, 2006.

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

RASSI JR, A.; RASSI, A.; DE REZENDE, J. M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America,** Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

ROFFÊ, E. et al. Role of CCL3/MIP-1α and CCL5/RANTES during acute Trypanosoma cruzi infection in rats. **Microbes and Infection,** Paris, v. 12, n. 8–9, p. 669–676, 2010.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, New York, v. 90, n. 3, p. 909–928, 1997.

SAHINGUR, S. E.; YEUDALL, W. A. Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 6, n. 214, 2015.

SALLUSTO, F. et al. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 187, n. 6, p. 875-883, 1998.

SANTOS, F. L. N. et al. Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 94, n. 5, p. 1034–1039, 2016.

SCAPINI, P. et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunological Reviews,** Copenhagen, v. 177, n. 1, p. 195–203, 2000.

SCHARFSTEIN, J.; GOMES, J. DE A. S.; CORREA-OLIVEIRA, R. Back to the future in Chagas disease: From animal models to patient cohort studies, progress in immunopathogenesis research. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, p. 187–198, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 97, n. 2, p. 6 - 8, 2011.

SOUSA, G. et al. Plasma chemokine as potential biomarker of cardiac morbidity in Chagas disease (HUM8P.330). **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 192, n. 1, 2014.

TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: Tissue parasitism and endogenous IFN-γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with Trypanosoma cruzi. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 8, p. 851–866, 2000.

TALVANI, A. et al. Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor–a in Chagasic Cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 38, n. 7, p. 943–950, 2004a.

TALVANI, A. et al. Chemokine Receptor Expression on the Surface of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Chagas Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n. 2, p. 214–220, 2004b.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 262-265, 2002.

TORTORA, G. G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

UDOKO, A. N. et al. Early Regulation of Profibrotic Genes in Primary Human Cardiac Myocytes by Trypanosoma cruzi. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 1-23, 2016. Disponível em: https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003747>. Acesso em: 28 Set. 2016.

VILLALTA, F. et al. The Cysteine-Cysteine Family of Chemokines RANTES, MIP-1a, and MIP-1b Induce Trypanocidal Activity in Human Macrophages via Nitric Oxide. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4690–4695, 1998.

WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD. **World Health Organization**. Geneva, v. 90, n.6, p. 33-44, 2015.



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

Pesquisador responsável: Yara de Miranda Gomes Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 17/05/2010 Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 33/10 Registro no CAAE: 0032.0.095.000-10

PARECER Nº 34/2010

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 07 de julho de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 07 de julho de 2010.

Aselle augegna Jouver

Observação: Anexos:

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

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

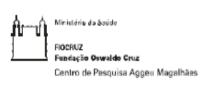




70

Barros, M. S. Anexos

ANEXO B - Carta de Anuência



CARTA DE ANUÊNCIA

Concordo em ceder amostras armazenadas no bio-repositório do Laboratório de Imunoparasitología de Departamento de Imunología do CPqAM/Fiocruz, as quais foram obtidas durante a execução do estudo intitulado "Avaliação de Marcadores Imunológicos em Portadores da Cardiopatia da Doença de Chagas Utilizando os Antígenos CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*" (0002.0.095.000-09, 0155.0.095.000-08). Estas amostras, que estão sob a minha guarda, serão utilizadas no projeto "Avaliação de quimiocinas na cardiopatia chagásica crônica" coordenado pela Dra. Virginia Lorena e desenvolvido pela da mestranda Michelle Barros vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnología em Saúde.

Recife, 02 de março de 2017

Yara de Miranda Gomes Pesquisadora em Saúde Pública Departamento de Imunologia Laboratório de Imunoparasitologia CPqAM/Fiocruz/PE