



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



**Correlação entre a expressão de receptores da resposta imune
inata e as formas clínicas na doença de Chagas humana**

Nathalie de Sena Pereira

Belo Horizonte/MG

Outubro/2014

Nathalie de Sena Pereira

**Correlação entre a expressão de receptores da resposta imune
inata e as formas clínicas na doença de Chagas humana**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Dr. Egler Chiari
Prof. Titular e Emérito da UFMG

Coorientador: Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes
Prof. Adjunto do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CB/UFRN

Colaboradores

Dra. Lúcia Maria da Cunha Galvão
Profa. Voluntária do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG
Dr. Cléber de Mesquita Andrade
Professor da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN)

Belo Horizonte/MG
Outubro/2014

043 Pereira, Nathalie de Sena.
Correlação entre a expressão de receptores da resposta imune inata e as formas clínicas na doença de Chagas humana [manuscrito] / Nathalie de Sena Pereira. – 2014.

58 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Egler Chiari. Co-orientador: Paulo Marcos da Matta Guedes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Chagas, Doença de - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Imunidade inata. 4. Receptores Toll-Like. 5. Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos. 6. Citocinas - Teses. 7. Parasitologia - Teses. I. Chiari, Egler. II. Guedes, Paulo Marcos da Matta. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88./89

Instituições envolvidas



Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Departamento de Parasitologia, Av. Antônio Carlos, 6627, Bloco L4, Sala 179, Campus Pampulha, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Telefone: 31 3409-2847/2968.



Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Biociências. Av. Salgado Filho, 3000, Campus Universitário, Lagoa nova, 59072-970 Natal, RN, Telefone 84 3215-3439.



Laboratório de Biologia de Parasitos e Doença de Chagas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia 2º Andar, Rua Gal. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, Petrópolis, 59012-570 Natal, RN, Telefone: 84 3342-9827.



Secretarias Municipais de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Norte.

Apoio financeiro



MCT/CNPq Universal 14/2013 Proc. N° 475572/2013-0



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



Ministério da
Saúde



Chamada N° 40/2012–
Pesquisa em Doenças
Negligenciadas Proc. N°
404056/2012-1



Programa Nacional de Incentivo à Pesquisa em Parasitologia Básica Edital N° 032/2010 Proc.
N°

23038.005288/2011-48



Edital 5/2011 - PPPIV N° 79

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei,
se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.*

As facilidades nos impedem de caminhar.

Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, pelo apoio em minha educação e em minhas decisões.

Ao meu orientador, Professor Egler Chiari, que mesmo sem me conhecer confiou em mim e me aceitou como sua aluna, contribuindo bastante em minha formação com sua sinceridade e experiência, sempre acrescentando em seus comentários.

Ao Professor Paulo Guedes, que desde a graduação auxilia em minha formação, pelo apoio e incentivo a minha ida para o Programa de Pós-Graduação em Parasitologia na UFMG. Sempre presente, prestativo e ajudando no que for necessário.

À Professora Lúcia Galvão, colaboradora deste trabalho, pela participação direta em minha formação, com sua sinceridade e seriedade, sempre tendo algo importante a acrescentar, informações que procuro sempre guardar.

Ao Professor Cléber de Mesquita Andrade, colaborador deste trabalho, que como médico do grupo de pesquisa foi responsável pelas avaliações clínicas dos pacientes.

À Professora Antônia Cláudia Câmara, pela atuação no delineamento das viagens ao campo e coletas de sangue e o suporte para o diagnóstico sorológico dos pacientes.

Aos colegas do laboratório pelo contínuo auxílio e descontração nos momentos de trabalho, especialmente a Denis Dantas, meu braço direito, e aqueles que participaram diretamente nesse trabalho, nas coletas de campo e sorologia dos pacientes: Andressa Noronha, Kiev Martins e Daniela Nunes, também, pelo auxílio nas correções.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pelos ensinamentos e dedicação, em especial aos Professores Walter Lima e Alan Lane de Melo, com quem tive maior proximidade mesmo após as disciplinas.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, que sempre auxiliam na resolução dos problemas, mesmo a distância.

À melhor turma de todos os tempos, a turma do Naldo! Que deixaram as aulas mais leves e divertidas, com certeza a melhor época de todas!

Aos amigos da graduação que continuam presentes compartilhando das mesmas experiências e frustrações e que deixam nossa vida mais leve durante as horas de lazer.

Às amigas de longa data da Escola Doméstica, pela amizade verdadeira que até hoje continua, como nos tempos do vestidinho branco.

Aos amigos Ítalo, que com seus conhecimentos em georreferenciamento me concedeu um mapa lindo, e **Dani Bolina**, pela amizade e favores na entrega dos documentos a distância.

Aos pacientes, que aceitaram fazer parte desse trabalho de pesquisa.

Àqueles que contribuíram de forma direta ou indireta neste trabalho.

RESUMO

Estudos recentes demonstraram a importância de receptores do tipo *Toll Like Receptors* (TLRs) e do tipo *NOD Like Receptors* (NLRs) durante a resistência à infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. Entretanto, não existem estudos que correlacionem a expressão destas moléculas às formas clínicas crônicas da doença de Chagas humana. Neste estudo, foi avaliada a expressão de receptores da imunidade inata (TLRs e NLRs), suas moléculas adaptadoras, citocinas e α -defensinas, em pacientes chagásicos crônicos com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença. Amostras de indivíduos não infectados da mesma região geográfica foram utilizadas como controle (n=9). A partir das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi realizada a quantificação da expressão de RNA mensageiro (RNAm) por PCR em tempo real, dos TLRs (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9), NLRs (NOD1 e NOD2), de moléculas adaptadoras RIP2 (*Receptor-interacting protein kinase 2*), TRIF (*Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β*) e Myd88 (*Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*), citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IFN- α) e α -defensinas (5 e 6). Não houve diferença na expressão de RNAm para os TLRs (TLR1, 2,3,4,5,6,7 e 9) e para a molécula adaptadora TRIF entre os pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Entretanto, pacientes com a forma clínica cardiodigestiva expressaram maior quantidade de RNAm de TLR8 e Myd88, quando comparado aos pacientes com as formas clínicas cardíaca e indeterminada. Os pacientes com a forma cardíaca apresentaram elevada expressão de RNAm de IL-1 β e IL-12 que aqueles com a forma indeterminada, que estão associadas ao desenvolvimento de doença cardíaca grave. Além disso, não houve diferença entre a expressão das citocinas (IL-6, IL-18 e IFN- α). Os pacientes com a forma digestiva da doença apresentaram menor expressão de NOD2 e maior expressão de RIP2, quando comparado aos pacientes com a forma indeterminada. Houve uma correlação negativa entre a expressão de RNAm de NOD2 e o grau de dilatação do esôfago (R=-0,7859, p=0,0172) e a dimensão do sigmóide (R=-0,7859, p=0,0172). Os pacientes com a forma digestiva apresentaram elevada expressão de α -defensina 6. Estes dados indicam que a elevada expressão de RNAm para IL-1 β e IL-12 está relacionada à cardiomiopatia chagásica crônica e, a ausência ou baixa expressão de NOD2, correlacionada à gravidade na forma digestiva da doença de Chagas.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, formas clínicas, receptores da imunidade inata, *Toll* (TLRs) e *NOD* (NLRs), citocinas.

ABSTRACT

Recent studies have established the importance of Toll Like Receptors (TLRs) and Nod Like Receptors (NLRs) in resistance for *Trypanosoma cruzi* infection in experimental models. However, there are not studies correlating the expression of these molecules to clinical forms of chronic human Chagas disease. In this study, we aim to evaluate the expression of innate immunity receptors (Toll and Nod), signaling molecules, cytokines and α -defensins in patients with chronic Chagas disease that displayed indeterminate (n=18), cardiac (n=17), digestive (n=9) and cardiogestive (n=10) clinical forms. Uninfected individuals from the same geographical region were used as control (n=9). The quantification of mRNA expression was performed by real-time PCR, from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), TLRs (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9), NLRs (NOD1 and NOD2), the adapter molecules RIP2 (Receptor-interacting protein kinase 2), TRIF (Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β), Myd88 (Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88), cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 and IFN- α) and α -defensins (5 and 6). There was no difference in the expression of mRNA for TLRs (TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 9) and the adapter molecule TRIF between patients presenting different clinical forms of Chagas disease. However, patients with cardiogestive form displayed highest expression of TLR8 and Myd88 mRNA compared to cardiac and indeterminate clinical forms. Patients with cardiac form showed higher mRNA expression of IL-1 β and IL12, which is associated with the development of severe cardiac disease. Furthermore, there was no difference between the expression of other cytokines analyzed (IL-6, IL-18 and IFN- α). Patients with digestive form of the disease showed lower expression of NOD2 and higher expression of RIP2 compared with indeterminate form. Also, there was a negative correlation between the expression of NOD2 and the degree of dilation of the esophagus ($R=-0.7859$, $p=0.0172$) and sigmoid ($R=-0.7859$, $p=0.0172$). Patients with digestive form showed higher expression of α -defensin 6. The results indicate that high mRNA expression of IL1- β and IL-12 is correlated to chronic Chagas cardiomyopathy, and the absence or low NOD2 mRNA expression is correlated with the severity of digestive clinical form of Chagas disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, clinical forms, innate immunity receptors, Toll (TLRs) and NOD (NLRs), cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS

- Anti-IgG:** Anti-imunoglobulina G
- CARD:** Cardíaca
- CARDIG:** Cardiodigestiva
- CCC:** Cardiopatia Chagásica Crônica
- CD:** *Cluster of Differentiation* (exemplo CD80)
- cDNA:** Ácido desoxirribonucléico complementar
- CN:** Controle negativo
- CT:** *Cyclethreshold*
- DIG:** Digestiva
- DNA:** Ácido desoxirribonucléico
- dNTPs:** Bases nitrogenadas
- DP:** Desvio Padrão
- ECG:** Eletrocardiograma
- ELISA:** *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- FEVE:** Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
- GIPL:** Glicosilinositolfosfolípideo
- Gp:** Glicoproteína (exemplo gp90)
- GPI:** Glicosilfosfatidilinositol
- HAI:** Hemaglutinação indireta
- IFN:** Interferon
- IgA:** Imunoglobulina do isótipo A
- IKK:** Inibidor de NF-KB kinase
- IKKB:** Inibidor fosforilado de NF-KB kinase
- IL:** Interleucina (exemplo IL-10)
- IND:** Indeterminada
- iNOS:** Inducible nitric oxide synthase
- MAPKs:** MAP Kinases
- MDP:** Muramildipeptídeo
- MHC:** *Major histocompatibility complex*
- mRNA/ RNAm:** RNA mensageiro
- MyD88:** *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88*
- NF-KB:** Fator nuclear kappa-B

NLRs: *NOD like receptors*

NO: *Nitric Oxide*

NOD: *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain* (exemplo NOD1)

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cell*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: *Polimerase chain reaction*

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*

RIFI: *Reação de Imunofluorescência Indireta*

RIG/RLRs: *RIG Like receptor family*

RIP2: *Receptor-interacting protein kinase 2*

RNA: *Ácido ribonucléico*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

Rq: *Quantidade relativa*

SNA: *Sistema nervoso autônomo*

TCD: *Linfócitos T Cluster of Differentiation* (exemplo: **TCD8⁺**)

TCR: *T Cell Receptor*

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

Th: *Linfócitos T help*

TLR: *Toll Like Receptors* (exemplo TLR2)

TNF α : *Tumor Necrosis Factor-alpha*

Toll: *Receptores do tipo Toll*

TRIF–Toll/IL1R: *Domain Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β*

UERN: *Universidade do Estado do Rio Grande do Norte*

WHO: *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cascatas de sinalização dos receptores da imunidade inata (*Toll Like Receptor*-TLR e *Nod Like Receptor*-NRL). Após o reconhecimento de PAMPs pelos receptores do tipo *Toll* e NOD, estes sofrem mudanças conformacionais, permitindo o recrutamento de moléculas adaptadoras, como Myd88, TRIF e RIP2. O tipo de sinalização depende da combinação de diferentes PAMPs, resultando no recrutamento de diferentes moléculas reguladoras. As moléculas irão ativar NF κ B, membros da família das MAP quinases e JUN quinases, induzindo a produção de mediadores inflamatórios (Uematsu & Akira 2006-modificado)..... 22
- Figura 2.** Reconhecimento do *Trypanosoma cruzi* pelos *Toll Like Receptors*-TLRs (Kayama & Takeda 2010). 23
- Figura 3.** Mapa do Estado do Rio Grande do Norte destacando em preto os municípios de origem dos pacientes selecionados para o estudo..... 27
- Figura 4.** Expressão de RNAm de TLR1 (A), TLR2 (B) e TLR3 (C), TLR4 (D), TLR5 (E), TLR6 (F), TLR7 (G), TLR8 (H) E TLR9 (I) determinadas por PCR em tempo real a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença de Chagas crônica. Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm DP. CN: Controle Negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica)..... 34
- Figura 5.** Expressão de RNAm de Myd88 (A) e TRIF (B) determinadas por PCR em tempo real a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença. Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm DP. CN: Controle Negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica) * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ 35
- Figura 6.** Expressão de RNAm de IL-1 β (A), IL-12 (B), IL-18 (C), IL-6 (D) e IFN- α (E) determinadas por PCR em tempo real a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença de Chagas crônica. Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm DP. CN: Controle Negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica). 36
- Figura 7.** Expressão de RNAm de NOD1 (A), NOD2 (B) e RIP2 (C) determinadas por PCR em tempo real a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença de Chagas crônica. Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm o desvio padrão (DP). CN: Controle negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica) * $p \leq 0,05$ 37

Figura 8. Expressão de RNAm de α -defensina 5 (A) e α -defensina 6 (B) determinadas por PCR em tempo real a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença. Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm DP. CN: Controle negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica) *p \leq 0,05. 37

Figura 9. Correlação entre a expressão de RNAm, determinada por PCR em tempo real, entre IL-12 e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (A); IL-12 e o índice cardiotorácico (B) de pacientes com a forma clínica cardíaca (n=17); NOD2 com megaesôfago (C) e megacólon -sigmoide (D), RIP2 com reto (E) e megacólon-sigmoide (F) de pacientes com as formas digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença de Chagas crônica *p \leq 0,05; ***p \leq 0,001. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Receptores da imunidade inata (TLRs e NLRs) e seus respectivos ligantes (Wilmanski <i>et al.</i> 2008; Uematsu & Fujimoto 2010-modificado)	21
Tabela 2. Caracterização da população estudada. Foram avaliados pacientes chagásicos com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) provenientes de dez municípios do oeste do estado do Rio Grande do Norte.	28
Tabela 3. Parâmetros eletrocardiográficos, radiográficos e ecocardiográficos dos pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença de Chagas.	29
Tabela 4. Sequência dos iniciadores específicos utilizados nas reações de PCR em tempo real.	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS	17
1.2 PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS	17
1.3 O SISTEMA IMUNE FRENTE AO PARASITO.....	19
1.3.1 Resposta imune na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.3.2 Receptores da imunidade inata	20
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	27
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL E NOD, MOLÉCULAS ADAPTADORAS, SUAS CITOCINAS E α -DEFENSINAS	30
4.2.1 Coleta de sangue e obtenção de PBMC	30
4.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	30
4.2.3 PCR em Tempo real (q-PCR)	31
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	40
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
9 ANEXO	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e epidemiologia da doença de Chagas

Em meados de 1907 o pesquisador Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas foi enviado para o norte de Minas Gerais, para que participasse do trabalho de controle ao paludismo na região, onde estava sendo construída a estrada de ferro Central do Brasil. Durante esse período de pesquisa e contato com as pessoas, Carlos Chagas descobriu uma nova moléstia, realizando um feito único na história da ciência, descrevendo o agente etiológico, o reservatório doméstico (gato), o ciclo evolutivo do parasito, o vetor-*Panstrongylus megistus*, além de identificar o primeiro caso clínico da doença (Chagas 1909). Mesmo descrita há 105 anos, a doença de Chagas ainda é endêmica nos países da América Latina, sendo que a estimativa é de sete a oito milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (WHO 2014). No Brasil, ainda se estima que há dois a três milhões de indivíduos infectados e 6000 mil mortes/ano (Martins-Melo *et al.* 2014).

O último inquérito nacional de soroprevalência realizado entre 2001 a 2008 no Brasil em 104.954 crianças até cinco anos de idade relatou 32 crianças (0,03%) com sorologia reativa, sendo 11 casos indicativos de transmissão vetorial, distribuídos principalmente na região Nordeste, incluindo o Rio Grande do Norte, Piauí, Ceará, Paraíba e Alagoas (Ostermayer *et al.* 2011). Diferentemente de outras regiões do Brasil, a região Nordeste, durante o período de 1999 a 2007, tem apresentado mortalidade crescente de indivíduos infectados, com aumento de 38,5% durante esse período analisado (Martins-Melo *et al.* 2012a). Esses dados corroboram com o estudo realizado dentro de um período mais longo, 1979 a 2009, que demonstrou o crescimento da mortalidade nessa região (Martins-Melo *et al.* 2012b). No estado do Rio Grande do Norte, segundo o Programa de Controle da doença de Chagas, desenvolvido pela Secretaria de Estado da Saúde Pública (SESAP) foram notificados 187 casos crônicos durante o período de 2007 a 2011, sendo a maioria dos casos nos municípios de Mossoró e Pau dos Ferros, localizados na mesorregião oeste, e no município de Caicó situado na mesorregião central do estado (Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte-SESAP, 2012). Dados recentes mostraram que a estimativa de soroprevalência para a mesorregião oeste foi de 6,5% e 3,3% em Caicó, município localizado na mesorregião central (Brito *et al.* 2012).

1.2 Patogenia da doença de Chagas

A infecção pelo *T. cruzi* apresenta duas fases distintas: uma caracterizada pela infecção recente ou fase aguda, que pode ser de caráter assintomático ou oligossintomático,

na maioria dos casos; ou mesmo casos sintomáticos com presença de febre, hepatoesplenomegalia, adenomegalia, edema bipalpebral unilateral (sinal de Romaña), chagoma de inoculação, miocardite e meningoencefalite (Chagas 1916). Passado o período de fase aguda que em geral pode durar dois a quatro meses, o indivíduo evolui para a fase crônica e pode desenvolver as formas clínicas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva ou mesmo permanecer sem sintomas, caracterizando a forma indeterminada da doença. Os determinantes da evolução da doença de Chagas estão relacionados ao número de formas tripomastigotas do *T. cruzi* na infecção inicial; às formas infectantes e as DTUs (*discrete typing units*) do *T. cruzi* na inoculação inicial; a qualidade das cepas e clones (biodemas); às reinfecções; aos receptores histotrópico-clonal específicos do hospedeiro vertebrado e sua resposta imune (Coura 1988; Macedo & Pena 1998; Andrade *et al.* 2006; Teixeira *et al.* 2006; Zingales *et al.* 2009). O prognóstico da doença de Chagas depende da forma clínica e das complicações durante a sua evolução. Durante a fase aguda, depende da idade do paciente, da intensidade e localização das lesões (Coura & Borges-Pereira 2010). Cerca de 60 a 70% dos chagásicos crônicos permanecem assintomáticos por um longo período, apresentando eletrocardiograma de repouso, radiografia do tórax, esôfago e cólon normais, com sorologia convencional reativa, caracterizando a forma indeterminada da doença. Desses pacientes, 10% desenvolvem a forma digestiva da doença, que pode acometer os órgãos do trato gastrointestinal, principalmente esôfago e cólon, devido a lesões no sistema nervoso autônomo intramural, parasitismo tecidual e ação do sistema imune, levando ao aparecimento de megaesôfago e megacólon, respectivamente. As lesões digestivas predominam no esôfago e no cólon terminal, justamente nesses segmentos que trabalham conteúdos mais sólidos, envolvendo alterações motoras, anatômicas e de absorção (Andrade *et al.* 2000; Rezende & Moreira 2000). As lesões anatomopatológicas de base consistem em denervação parassimpática intramural, sendo resultante de lesões inflamatórias crônicas, em particular no plexo mioentérico do sistema nervoso autônomo (SNA). Funcionalmente, os processos patogênicos resultam em estase e discinesia que, por sua vez, agravam as lesões do SNA (Tafari & Raso 1983). Aproximadamente 20 a 30% dos indivíduos desenvolvem a forma cardíaca da doença, que pode causar desde a presença de anormalidades silenciosas até formas graves, como insuficiência cardíaca refratária ou morte súbita. A lesão cardíaca pode estar relacionada a fatores como, destruição direta do tecido muscular cardíaco pelo parasitismo, fibrose e autoimunidade, devido à presença de autoanticorpos e linfócitos TCD8⁺ autorreativos que reagem com o tecido cardíaco e

estruturas vasculares. A forma cardiodigestiva é uma ocorrência concomitante de lesões compatíveis com as formas cardíacas e digestivas (Chagas & Vilela 1922; Rezende *et al.* 1960; Cossio *et al.* 1974a; Dias 1995; Brasil 2005; Rassi Jr *et al.* 2010).

As causas da patogenia da doença de Chagas ainda não estão totalmente esclarecidas, a dificuldade em detectar o parasito no miocárdio levou a de postular teorias para explicar o desenvolvimento das lesões como, a teoria autoimune (Magarino-Torres 1929; Cossio *et al.* 1974a, Cossio *et al.* 1974b; Teixeira *et al.* 2011), embora dados na literatura também demonstrem o papel do parasito com participação ativa na cardiopatia chagásica crônica (Jones *et al.* 1993; Higuchi 1995; Belloti *et al.* 1996; Añez *et al.* 1999). Evidências demonstraram a presença do parasito em tecidos do esôfago de pacientes chagásicos que não apresentam megaesôfago, assim como em pacientes com diferentes estágios da forma digestiva, podendo então inferir na atuação de outros fatores que não apenas a presença do parasito no tecido (Vago *et al.* 1996; Vago *et al.* 2000; Lages-Silva *et al.* 2001; Vago *et al.*, 2003; Lages-Silva *et al.* 2006). Desta forma, o parasito além de poder causar a lesão tecidual, pode agir juntamente com a resposta imune do hospedeiro na formação de lesões, e os mecanismos imunopatogênicos envolvidos na gênese das lesões durante a fase crônica. O balanço entre as citocinas proinflamatórias, anti-inflamatórias, quimiocinas e o perfil do infiltrado inflamatório são fatores importantes na patogenia ou resistência à infecção pelo *T. cruzi* (Dutra *et al.* 1994; Teixeira *et al.* 2002; Gomes *et al.* 2003).

1.3 O sistema imune frente ao parasito

1.3.1 Resposta imune na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

A resposta imune celular inata inicia com reconhecimento do parasito pelas células apresentadoras de antígenos através de receptores (PRRs) que reconhecem padrões moleculares presentes no parasito como, açúcares presentes na superfície e ácidos nucleicos. Este reconhecimento gera uma cascata intracelular a qual induz a produção de citocinas e moléculas coestimulatórias (CD80/86) para o direcionamento da resposta imune adaptativa, que ocorre juntamente pela apresentação dos antígenos processados via MHC de classe I e II (Kawai & Akira 2010). Como o *T. cruzi* está presente no citoplasma celular, há importante participação do MHC de classe I no processamento e apresentação do antígeno pelo reconhecimento de linfócitos T CD8⁺ (Buckner *et al.* 1997).

O *T. cruzi*, quando fagocitado por macrófagos, induz a produção de interleucina-12 (IL-12), que age sobre as células *natural killer* (NK) levando à sua ativação e proliferação. Ocorre então maior produção de IL-12 e interferon gama (IFN- γ) (Aliberti *et al.* 1996),

este, com o auxílio do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), induz a ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) levando à síntese de radicais livres de oxigênio (superóxido) e de nitrogênio (peroxinitrito), limitando a multiplicação do parasito. A interleucina-10 (IL-10), o fator de crescimento tumoral (TGF- β) e a interleucina-4 (IL-4) agem de forma oposta, inibindo iNOS e indiretamente levando ao aumento da replicação do parasito (Wirth & Kierszenbaum 1985; Silva *et al.* 1991; Abrahamsohn & Coffman 1996; Hölscher *et al.* 1998; Silva *et al.* 1998). Estas citocinas produzidas durante a resposta imune inata conduzem a resposta imune adaptativa para os diferentes perfis de resposta imune como os perfis Th1, Th2 (Silva *et al.* 1992) e também de linfócitos Th17 e T reguladores (Mariano *et al.* 2008).

1.3.2 Receptores da imunidade inata

Os PRRs são responsáveis por reconhecer estruturas conservadas entre as espécies de microrganismos, denominados de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (**Tabela 1**). Atualmente foram identificadas quatro famílias de PRRs, incluindo proteínas transmembranas (receptores do tipo *Toll*/TLRs e lectinas do tipo C) e proteínas citoplasmáticas (receptores do tipo RIG/RLRs e receptores do tipo NOD/NLRs). Esses receptores variam quanto à sua localização celular, podendo estar presentes na membrana plasmática, nos endossomos, lisossomos e mesmo soltos no citosol (**Figura 1**). Com exceção de alguns NLRs, o reconhecimento de padrões moleculares induz o aumento da transcrição de genes envolvidos nas respostas inflamatórias (Takeuchi & Akira 2010; Rodrigues *et al.* 2012).

Em relação aos receptores do tipo *Toll*, 10 e 12 membros funcionais da família foram identificados no homem e em camundongos, respectivamente, dos quais os TLRs 1–9 são conservados em ambas as espécies. O TLR10 é seletivamente expresso em humanos, já os TLR11, TLR12 e TLR13 estão presentes apenas nos camundongos (Kawai & Akira 2010). Dados na literatura têm demonstrado como a sinalização do sistema TLR responde a infecções pelos protozoários *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. e *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli & Denkers 2006). Os receptores do tipo *Toll* são expressos por células apresentadoras de antígenos profissionais, além de células endoteliais, fibroblastos e mesmo plaquetas, estando expresso já no primeiro trimestre de formação em trofoblastos, podendo ocorrer na superfície celular e em compartimentos endossomais (Takeuchi & Akira 2010; Anabel *et al.* 2014; Tangerang *et al.* 2014).

As vias de sinalização específicas têm sido identificadas para alguns TLRs, envolvendo diferentes moléculas adaptadoras responsáveis pela transdução de sinal. Isto conduz a perfis de liberação de citocinas específicas para determinados PAMPs, sendo assim, os TLRs conferem um determinado grau de especificidade para a resposta imune inata (Akashi-Takamura & Miyake 2008). Essas vias de sinalização podem ser dependentes das moléculas adaptadoras Myd88 (*Myeloid differentiation primary-response-gene-88*), ou independente dessa molécula, sendo TRIF (*Toll/IL1R domain containing adaptor protein*) dependentes.

Em relação ao papel de cada TLR, foi demonstrado que camundongos deficientes em TLR4, experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*, apresentam parasitemia mais elevada que os animais controle, o que poderia ser explicado devido ao fato destes animais produzirem menor quantidade de IFN- γ , TNF- α e óxido nítrico que os animais selvagens, não interferindo na taxa de mortalidade (Oliveira *et al.* 2010).

Tabela 1. Receptores da imunidade inata (TLRs e NLRs) e seus respectivos ligantes (Wilmanski *et al.* 2008; Uematsu & Fujimoto 2010-modificado)

Receptores	Ligantes
TLR1	Triacyl-lipopeptídeos (bactéria)
TLR2	Glicosilfosfatidilinositol (protozoários); Peptidoglicanos, lipoproteína, lipopeptídeos, LPS atípico (bactéria); Envelope protéico (vírus); Zimosan, Fosfolipomanana (Fungos)
TLR3	dsRNA (vírus)
TLR4	Glicosilinositolfosfolípídeo (protozoários); LPS (bactéria); Manana, Glicoronoxylmanana (fungos), Proteína de fusão do vírus sincicial respiratório (vírus)
TLR5	Flagelina (bactéria)
TLR6	Diacyl-lipopeptídeo (bactéria)
TLR7/TLR8	ssRNA, Moléculas sintéticas semelhante a imidazolina (vírus)
TLR9	CpG DNA (Protozoários, bactérias, vírus), hemozoína (Protozoários)
NOD1	Ácido <i>meso</i> -diaminopimélico (iE-DAP) (bactéria)
NOD2	Muramildipeptídeo-MDP (bactérias)

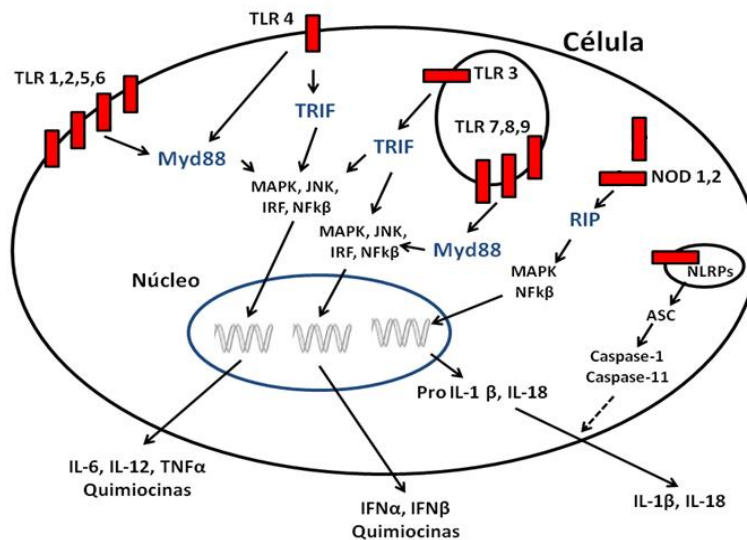


Figura 1. Cascatas de sinalização dos receptores da imunidade inata (*Toll Like Receptor*-TLR e *Nod Like Receptor*-NLR). Após o reconhecimento de PAMPs pelos receptores do tipo *Toll* e NOD, estes sofrem mudanças conformacionais, permitindo o recrutamento de moléculas adaptadoras, como Myd88, TRIF e RIP2. O tipo de sinalização depende da combinação de diferentes PAMPs, resultando no recrutamento de diferentes moléculas reguladoras. As moléculas irão ativar NFκB, membros da família das MAP quinases e JUN quinases, induzindo a produção de mediadores inflamatórios (Uematsu & Akira 2006-modificado).

TLR9 é localizado no endossoma e pode reconhecer sequências de DNA. Camundongos infectados com o clone CL-Brener deficientes dessa molécula, apresentam parasitemia mais elevada que os animais controle. Embora animais deficientes de TLR2 não apresentem diferença em relação à parasitemia comparados aos animais controles, quando utilizados camundongos deficientes de TLR2 e TLR9, a parasitemia é mais elevada que naqueles deficientes apenas de TLR9, sendo semelhante aos animais deficientes da molécula adaptadora Myd88 (Bartholomeu *et al.* 2008). Um estudo envolvendo camundongos deficientes de TLR3, também infectados com o clone CL- Brener, mostrou o papel redundante dessa molécula na susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* (Caetano *et al.* 2011). Porém, como ocorrido com camundongos duplo-nocautes de TLR2 e TLR9 e infectados com a cepa Y, o TLR3 pode interagir com outros receptores *Toll* para auxiliar no controle da infecção (Bafica *et al.* 2006). TLR7 está envolvido no reconhecimento de RNA do *T. cruzi* e resistência à infecção, pelo clone CL-Brener (Caetano *et al.* 2011). Até o momento, a análise de animais deficientes infectados com diferentes DTUs como, Y e CL-Brener, demonstrou que os TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9 desempenham papel na

resistência à infecção por *T. cruzi* (**Figura 2**) e, que pode haver interação entre eles (Oliveira *et al.* 2010; Rodrigues *et al.* 2012). O papel dos receptores do tipo *Toll* na evolução das formas clínicas, cardíaca e digestiva durante a infecção crônica humana ainda não está definido. Estudo envolvendo 169 pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC) e 76 com forma indeterminada da doença mostrou que os pacientes que são heterozigóticos para a variante MAL/S180L TIRAP, o que leva a uma diminuição na transdução de sinal após a ligação de TLR2 ou TLR4 ao respectivo ligante, podem apresentar menor risco de desenvolver CCC (Ramasawmy *et al.* 2009). Por outro lado, foi demonstrado também que TLR2 funciona como o principal regulador da hipertrofia, desencadeada em cardiomiócitos murinos infectados pelo *T. cruzi* (Petersen *et al.* 2005).

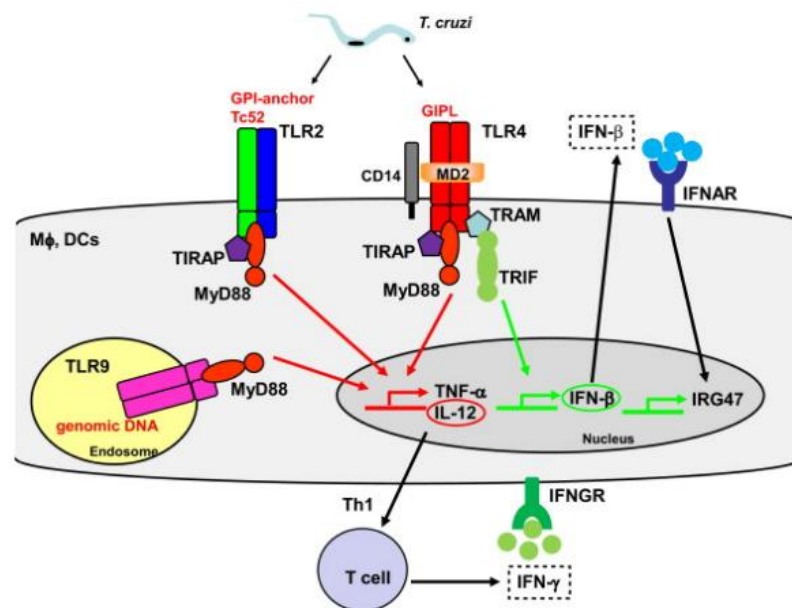


Figura 2. Reconhecimento do *Trypanosoma cruzi* pelos *Toll Like Receptors*-TLRs (Kayama & Takeda 2010).

As proteínas da classe dos receptores NOD (*Nod like receptors*-NLR) representam uma subclasse de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) composto por um domínio central de oligomerização de nucleotídeos, denominado de NOD; um domínio efetor N-terminal (um domínio recrutador de caspase ou por domínios de repetição inibidor da proteína de Baculovírus) que se liga a moléculas da cascata de sinalização; e um domínio C-terminal que é caracterizado por uma região rica em leucina e reconhece os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (Proell *et al.* 2008). NOD1 é expresso em muitos tipos de células e organismos, enquanto NOD2 parece ser mais restrito e tem sido descrito em células hematopoiéticas, células de *Paneth*, células intestinais, do

epitélio oral, do pulmão, e em baixos níveis nos linfócitos (Franchi *et al.* 2009; Biswas *et al.* 2012). NOD1 reconhece peptídeos contendo ácido meso-diaminopimélico, encontrado em todas as bactérias gram-negativas e também em algumas gram-positivas; já o NOD2 reconhece muramildipeptídeo (MDP) conservados em peptídeo glicano de todos os tipos de bactérias (Ogura *et al.* 2001; McDonald *et al.* 2005). A estimulação de NOD1 e NOD2 resulta na ativação de NF- κ B e MAP quinases (MAPKs), que estão envolvidos na transcrição de genes implicados na resposta imune inata e adaptativa (Hayden & Ghosh 2004). Com reconhecimento do estímulo, NOD1 e NOD2 recrutam a quinase serina-treonina RICK, também denominada de proteína de interação com receptor 2 (RIP2), que se liga diretamente ao modulador essencial de NF- κ B e IKK. Uma vez ativada, IKK fosforila o inibidor I κ B, induzindo sua degradação no proteossoma, ativando NF- κ B e provocando sua translocação até o núcleo (Franchi *et al.* 2009).

Camundongos deficientes de NOD1 são resistentes à infecção experimental pela cepa Y do *T. cruzi*, resistência essa associada à redução de produtos dependentes da indução de NF- κ B, vista em macrófagos murinos deficientes de NOD1. Os camundongos deficientes de NOD1 comportaram-se de maneira similar aos deficientes de Myd88 e iNOS, não sendo observada diferença nos níveis de citocinas, indicando que NOD1 atua de uma maneira independente da produção de citocinas. Já o receptor NOD2, não apresentou algum tipo de correlação com resistência ou susceptibilidade (Silva *et al.* 2010). O papel de NOD2 tem sido correlacionado com uma doença inflamatória crônica do trato gastrointestinal, a doença de *Crohn*, caracterizada por intensa inflamação no íleo terminal (Hisamatsu *et al.* 2003). A função do NOD2 na lesão inflamatória intestinal acontece pelo reconhecimento inicial dessa molécula por MDP, que está presente em bactérias, como aquelas presentes na microbiota. Esse receptor é predominantemente expresso nas células de *Paneth*, células que também são responsáveis pela produção de peptídeos antimicrobianos, como as α -defensinas (5 e 6), que também estão menos expressas em pacientes com doença de *Crohn*, e sua expressão parece ser regulada ou influenciada por NOD2 (Ganz & Lehrer 1994; Wehkamp *et al.* 2004). A associação entre esses receptores e as formas crônicas da doença de Chagas ainda não foram investigadas, desta forma, a nossa hipótese é de que a expressão de moléculas da resposta imune inata está relacionada à manifestação das diferentes formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos têm demonstrado a participação de moléculas da imunidade inata na resistência à infecção experimental pelo *T. cruzi*. Animais deficientes de receptores do tipo *Toll* como, TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9 e da molécula adaptadora Myd88, podem apresentar redução na produção de citocinas inflamatórias e óxido nítrico, apresentando parasitemia elevada e sucumbindo à infecção. Dados na literatura demonstraram que o receptor intracelular NOD1 também é importante na resistência à infecção experimental pelo *T. cruzi*. Macrófagos provenientes de camundongos nocautes NOD1 apresentaram redução de produtos dependentes da indução de NF-KB e falharam em controlar a infecção na presença de IFN- γ . Entretanto, poucos estudos correlacionam à expressão dos receptores da imunidade inata às formas clínicas crônicas da doença de Chagas humana. Neste trabalho, avaliamos a expressão de RNAm dos TLRs e NLRs, moléculas adaptadoras, citocinas e α -defensinas, a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Além disso, correlacionamos com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e dimensões do cólon e esôfago. Os estudos relativos aos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência à infecção pelo *T. cruzi* e na patogenia da doença de Chagas crônica podem servir de base para o melhor entendimento da história natural da doença bem como identificar marcadores imunológicos de progressão da infecção, resistência ou patogenicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de RNAm de moléculas associadas a imunidade inata em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a expressão de RNAm de receptores do tipo *Toll* (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9) e do tipo *Nod* (NOD1 e NOD2) em PBMC de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas;
- ✓ Avaliar a expressão de RNAm das moléculas adaptadoras RIP2, TRIF e Myd88 nos pacientes chagásicos crônicos com as diferentes formas clínicas;
- ✓ Avaliar a expressão de RNAm de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IFN- α) nos pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas;
- ✓ Avaliar a expressão de RNAm para as α -defensinas 5 e 6 nos pacientes com as diferentes formas clínicas;
- ✓ Correlacionar à expressão de RNAm dos receptores da imunidade inata com as moléculas adaptadoras, citocinas e α -defensinas;
- ✓ Verificar se há correlação entre a expressão de RNAm dos marcadores imunológicos com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo e/ou ao grau de dilatação do esôfago ou colón de pacientes com as formas clínicas cardíaca e digestiva.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de estudo

Para a realização deste trabalho foram selecionados indivíduos procedentes de dez municípios da mesorregião oeste do Estado do Rio Grande do Norte, sendo eles: Alexandria, Apodi, Caraúbas, Governador Dix-Sept Rosado, Ipanguaçu, Mossoró, Pendências, Rodolfo Fernandes, Serra do Mel e Severiano Melo (**Figura 3**).

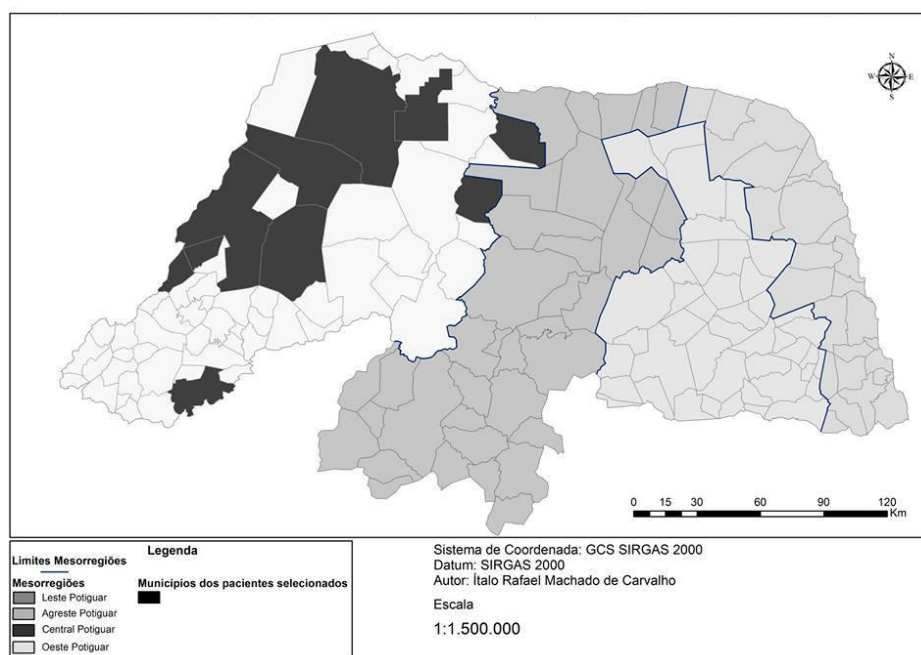


Figura 3. Mapa do Estado do Rio Grande do Norte destacando em preto os municípios de origem dos pacientes selecionados para o estudo.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERJ) sobre o protocolo de número N° 027.2011. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido estando em conformidade com a Resolução 196/96-CNS/MS (**Anexo**). A população selecionada foi constituída de 54 indivíduos na faixa etária de 18 a 79 anos de idade, e nove indivíduos saudáveis com faixa etária semelhante, residentes da mesma área endêmica, utilizados como controles. Os dados caracterizando a população chagásica estão contidos na **Tabela 2**. Esses indivíduos foram submetidos à triagem sorológica para confirmação da infecção pelo *T. cruzi* por pelo menos dois métodos com princípios ativos distintos, hemaglutinação indireta, Chagatest[®] HAI *screening* A-V, ELISA recombinante (Wiener Lab[®], Rosário, Argentina) e a reação de imunofluorescência indireta utilizando como antígeno as formas epimastigotas do *T. cruzi* da cepa Y conforme a metodologia anteriormente descrita

(Camargo 1966). As amostras com resultados inconclusivos foram submetidas à sorologia confirmatória por *Western blot* (TESAcruzi®, BioMérieux, Brasil) (Umezawa *et al.* 1996). Os resultados foram considerados positivos quando a amostra foi reativa em pelo menos dois dos métodos selecionados, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde e Consenso Brasileiro em doença de Chagas (Brasil 2005). A seguir, esses pacientes foram avaliados clinicamente por um membro do grupo (médico clínico-cardiologista) e as formas clínicas caracterizadas empregando eletrocardiograma (ECG), ecocardiograma transtorácico bidimensional, radiografias do tórax e contrastadas de esôfago e cólon (enema opaco). Aqueles pacientes com alterações eletrocardiográficas e/ou ecocardiográficas sugestivas de cardiopatia chagásica foram avaliados pelo Holter 24h. Os dados das avaliações clínicas foram gentilmente cedidos pelo médico colaborador deste trabalho (**Tabela 3**).

Tabela 2. Caracterização da população estudada. Foram avaliados pacientes chagásicos com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) provenientes de dez municípios do oeste do estado do Rio Grande do Norte.

	Formas Clínicas*				Total
	Indeterminada	Cardíaca	Digestiva	Cardiodigestiva	
Sexo	M=10/54 (55,5%)	M=11/54 (64,7%)	M= 5/54 (55,5%)	M= 7/54 (70%)	M=33/54 (61,1%)
	F= 8/54 (44,5%)	F= 6/54 (35,3%)	F=4/54 (44,5%)	F= 3/54 (30%)	F=21/54 (38,9%)
Total	18/54 (33,4%)	17/54 (31,4%)	9/54 (16,6%)	10/54 (18,5%)	54
Idade (anos)	41,4± 10,7	49,7± 11,8	60,7± 11,2	51,6 ± 11,8	49,3± 12,9
Presença de megacólon	-	-	5 (55,5%)	5 (50%)	10 (52,6%)
Presença de megaesôfago	-	-	2 (22,2%)	2 (20%)	4 (21%)
Presença de megacólon e megaesôfago	-	-	2 (22,2%)	3 (30%)	5 (26,4%)

M: Masculino; F: Feminino. *Dados gentilmente cedidos pelo médico colaborador deste trabalho.

Desse modo, os pacientes chagásicos que apresentaram eletrocardiograma, radiografias de tórax e contrastadas de esôfago e cólon normais, foram categorizados com a forma clínica indeterminada (IND, n=18); aqueles que apresentaram anormalidades eletrocardiográficas sugestivas de comprometimento cardíaco, sintomáticos ou não, foram classificados com a forma cardíaca (CARD, n=17); os pacientes com imagens do esôfago e/ou cólon alteradas, com a forma digestiva (DIG, n=9) e, os pacientes com cardiomiopatia associada com megacólon e/ou megaesôfago com a forma cardiodigestiva (CARDIG, n=10).

Tabela 3. Parâmetros eletrocardiográficos, radiográficos e ecocardiográficos dos pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença de Chagas.

Variáveis	Formas Clínicas							
	Indeterminada		Cardíaca		Digestiva		Cardiodigestiva	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Índice	0,43	0,043	0,48	0,049	0,42	0,03	0,50	0,05
Cardiotorácico								
FEVE (%)	64,6	3,42	55,8	14,96	65	6,48	56,2	13,84
Sigmoide (cm)	4,41	0,57	4,5	0,71	7,72	4,6	7,96	2,87
Reto (cm)	4,89	0,81	5,72	0,89	7,5	3,1	6,36	1,89
Grau do	-	-	-	-	0,66	0,86	0,9	1,28
Megaesôfago								

DP: Desvio Padrão; Valores de normalidade: Índice cardiotorácico $\leq 0,5$; Fração de ejeção do ventrículo esquerdo maior que 55%; Dimensão do sigmoide ≤ 5 cm; Dimensão do reto 1cm maior que o sigmoide; Esôfago normal classificação zero, e alterado graus I a IV. Dados gentilmente cedidos pelo médico colaborador deste trabalho.

4.2 Quantificação de RNA mensageiro de receptores do tipo Toll e Nod, moléculas adaptadoras, suas citocinas e α -defensinas

4.2.1 Coleta de sangue e obtenção de PBMC

Um total de 15mL de sangue periférico foi coletado em tubos a vácuo contendo o anticoagulante EDTA (*Vacutainer*[®], *BD Biosciences, USA*) para a separação das células mononucleares de sangue periférico (PBMC). O sangue foi lentamente aplicado em tubos cônicos de polipropileno com capacidade de 50mL (*Falcon, BD Biosciences, USA*) contendo uma solução Ficoll-Hypaque na proporção 2:1 (*Histopaque*[®] 1.077-*Sigma-Aldrich, USA*). Posteriormente, os tubos foram centrifugados a $800 \times g$ por 30min e o anel de células formado foi transferido para um novo tubo de 15mL e submetido à nova centrifugação a $110 \times g$ durante 20min. Por fim, as células que passaram pelo procedimento de separação foram re-suspendidas em 500 μ L de Trizol (*Invitrogen*[™], *Carlsbad, CA, USA*) e armazenadas em *freezer* à -20°C até o momento de realização dos procedimentos de extração de RNA e posterior síntese de cDNA.

4.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Esta análise foi realizada por meio do *kit* para extração de RNA (*SV RNA Purification System, Promega, USA*). Dessa maneira, ao conteúdo de células mononucleares do sangue periférico obtidas na etapa anterior e ressuspendidas em Trizol (*Invitrogen*[™]) adicionou-se 200 μ L de clorofórmio (*Sigma-Aldrich*), em seguida tais amostras foram agitadas durante 30s e os tubos centrifugados a $12000 \times g$ por 15min a 4°C . A fase aquosa foi transferida para outro tubo esterilizado, e adicionados 500 μ L de isopropanol. As amostras foram incubadas durante 15min a -20°C para a precipitação do RNA da fase aquosa e centrifugadas a $12.000 \times g$ por 15min a 4°C , com o sedimento lavado com etanol a 75%. Finalmente, as amostras de RNA foram re-suspendidas em 60 μ L de água Mili-Q estéril e livre de RNase, armazenadas a -70°C , até a confecção do DNA complementar (cDNA). O DNA genômico contido nas amostras foi digerido pelo tratamento com RNase-Free Dnase (*SV RNA Purification System, Promega*) de acordo com as especificações do fabricante. Uma alíquota de 5 μ L foi utilizada para a obtenção da concentração de RNA/ μ L nas amostras e determinada em espectrofotômetro (*Biomate 3 spectrophotometer Thermospectronic-Rochester, NY, USA*). Para a síntese do cDNA a partir da fita de RNA total, foi utilizado o *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystems, USA*) e o termociclador convencional (*MJ Research PTC-150*

MiniCycler). Os ciclos da reação foram de 10min a 25° C, 120min a 37°C, 5min a 85°C e ∞ a 4°C. A preparação do mix foi realizada em microtubos de polipropileno com capacidade para 0,5mL (*Sigma*), adicionando 2μL da solução tampão, 0,8μL de dNTPs na concentração de 100μM (*Bio Basic Inc., USA*), 1μL da enzima (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase*) e 2μL dos iniciadores (**Tabela 4**), 1μL do inibidor de RNase e 3μL de água Mili-Q (livre de nuclease).

4.2.3 PCR em Tempo real (q-PCR)

A análise da expressão quantitativa de genes de receptores da imunidade inata, suas moléculas adaptadoras, citocinas e α-defensinas foram realizadas por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando o sistema *SYBR Green®* em termociclador *7500 Fast Real time* (*Applied Biosystems, Warrington, USA*). As reações foram realizadas em placas de 96 poços (*MicroAmp®, Applied Biosystems, USA*) e, para cada gene alvo foi preparado um *Master mix* composto pelos iniciadores direto e reverso, *FAST SYBR® Green* (*Applied Biosystems, USA*) e água Mili-Q estéril para PCR. Foram utilizados iniciadores específicos para receptores do tipo *Toll* (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9) e do tipo *NOD* (Nod1 e Nod2), suas moléculas adaptadoras (RIP, TRIF e Myd88), citocinas (IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18 e IFN-α) e α-defensinas (5 e 6) descritos na **Tabela 4**, sintetizados com auxílio de *software* apropriado (*Primer Express, Applied Biosystems, USA*). O cDNA (2,5ng/reação) sintetizados a partir do RNA mensageiro e oligonucleotídeos específicos (1-2μg/reação), foram utilizados juntamente com os tampões da reação contendo 5μL de *Sybr® green*, 0,7μL de cada iniciador (direto e reverso), 1,6 μL de água e 2μL do cDNA. As condições das reações foram 2min a 50°C, 10min a 95°C, e 40 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 56°C. Um ciclo final de 20min com temperatura crescente de 60 a 95°C foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. As condições da PCR para cada iniciador utilizado foram padronizadas de acordo com a concentração, temperatura de anelamento, ausência de formação de dímeros (determinada pela curva de dissociação do produto gerado pela qPCR), eficiência de amplificação dos genes alvos e gene constitutivo. A determinação dos níveis de expressão dos genes alvo é realizada por meio da normalização das amostras quanto à expressão constitutiva de β-actina. Após a normalização dos resultados baseados na expressão do gene constitutivo, foi verificada a análise da expressão dos receptores, moléculas adaptadoras, citocinas e α-

defensinas estudadas com o cálculo baseado na fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ utilizando o programa *Microsoft Excel* (2007).

O equipamento utilizado para execução das reações e fornecimento dos resultados foi o *7500 Software V 2.0.5, 7500 Fast Real time (Applied Biosystems, USA)*. O nível de expressão de cada gene foi determinado pelo método de quantidade relativa (Rq). Inicialmente foi formada uma curva padrão relativa para cada gene utilizando-se cinco pontos obtidos por diluição seriada de uma amostra de cDNA com elevada concentração de genes alvos e constitutivo. Para cada paciente foi obtida a Rq de cada gene pelo valor de CT (*cycle threshold*) e a equação da reta obtida para cada um dos genes alvos. Os mesmos foram normalizados utilizando a Rq do controle endógeno (β -actina) e a expressão foi comparada entre os grupos avaliados.

Tabela 4. Sequência dos iniciadores específicos utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Iniciadores	Direto	Reverso
Hu- β -actina	TGA-CTC-AGG-ATT-TAA-AAA-CTG-GAA	GCC-ACA-TTG-TGA-ACT-TTG-GG
Toll 1	GGT-ACC-AGG-CCC-TCT-TCC-TCG-TTA- G	TAG-GAA-CGT-GGA-TGA-GAC-CGT- TTT-T
Toll 2	GTT-GCA-AGC-AGG-ATC-CAA-AGG- AGA-C	GCA-GAT-ACC-ATT-GCG-GTC-ACA- AGA-C
Toll 3	TGG-GTC-TGG-GAA-CAT-TTC-TCT-TC	TGA-GAT-TTA-AAC-ATT-CCT-CTT-CGC
Toll 4	TGA-ATT-TCT-ACA-AAA-TCC-CCG-ACA- A	AGA-GGT-GGC-TTA-GGC-TCT-GAT- ATG-C
Toll 5	GCT-GGA-CTG-CAG-TGA-CAC-AAT-CTC	GAG-AAG-CCA-CGT-TGT-CAG-TAG- CAT-C
Toll 6	GCA-AAA-ACC-CTT-CAC-CTT-GTT-TTT- C	CCA-AGT-CGT-TTC-TAT-GTG-GTT-GAG- G
Toll 7	TTT-ACC-TGG-ATG-GAA-ACC-AGC-TA	TCA-AGG-CTG-AGA-AGC-TGT-AAG-CTA
Toll 8	TTA-TGT-GTT-CCA-GGA-ACT-CAG- AGA-A	TAA-TAC-CCA-AGT-TGA-TGA-TCG- ATA-AGT-TTG
Toll 9	CCA-CCC-TGG-AAG-AGC-TAA-ACC	GCC-GTC-CAT-GAA-TAG-GAA-GC
Nod 1	GTG-GAC-AAC-TTG-CTG-AAG-AAT-GAC	CTG-TAC-CAG-GTC-CAG-AAT-TTT-GC
Nod 2	GCC-ACG-GTG-AAA-GCG-AAT	GGA-AGC-GAG-ACT-GAG-CAG-ACA
Myd88	CAA-GTA-CAA-GGC-AAT-GAA-GAA-AG	AAG-GCG-AGT-CCA-GAA-CCA
RIP 2	TGC-CAC-CTG-AAA-ACT-ATG-AAC-CT	ACA-CTT-CCC-ATG-TGA-TAA-CTG-CAT
IFN- α	GAA-GAA-TCT-CTC-CTT-TCT-CCT-GCC	ATG-GAG-GAC-AGA-GAT-GGC-TTG
IL-1 β	GCA-CGA-TGC-ACC-TGT-ACG-AT	AGA-CAT-CAC-CAA-GCT-TTT-TTG-CT
IL-6	CAA-ATT-CGG-TAC-ATC-CTC-GA	TGC-TGC-TTT-CAC-ACA-TGT-TAC-T
IL-12	CAC-TCC-CAA-AAC-CTG-CTG-AG	TCT-CTT-CAG-AAG-TGC-AAG-GGT-A
IL-18	AGG-AAT-AAA-GAT-GGC-TGC-TGA-AC	GCT-CAC-CAC-AAC-CTC-TAC-CTC-C
α -Defensina 5	GCC-ATC-CTT-GCT-GCC-ATT	GCT-TCT-GGG-TTG-TAG-CCT-CATC
α -Defensina 6	CCA-CTC-CAA-GCT-GAG-GAT	CTC-TGC-AAA-GGA-GAC-GGC

4.3 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas empregando o programa estatístico *Instat* e o software PRISM® 5.0 (*GraphPad, San Diego, CA, USA*). Para a verificação da distribuição normal dos dados, foram empregados os testes *Agostino-Pearson*, *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov*. Em grupos com distribuição normal, foram empregados os testes ANOVA e *Tukey-Kramer* para a determinação das diferenças entre expressão dos receptores do tipo *Toll*, *Nod*, moléculas adaptadoras, citocinas e α -defensinas dos pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Os testes *Kruskall-Wallis* e *Dunns*, foram empregados quando não houve distribuição normal desses dados. A correlação entre a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, o grau de dilatação do esôfago ou cólon com os marcadores imunológicos foram realizados através do teste não paramétrico de *Spearman*. As diferenças são consideradas significativas quando o valor de p for menor ou igual que 0,05 ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

A quantificação dos receptores da imunidade inata por meio de PCR em tempo real demonstrou que dentre os receptores do tipo TLRs, a expressão de RNAm para TLR1 (**Figura 4A**), TLR2 (**Figura 4B**), TLR3 (**Figura 4C**), TLR4 (**Figura 4D**), TLR5 (**Figura 4E**), TLR6 (**Figura 4F**), TLR7 (**Figura 4G**) e TLR9 (**Figura 4I**), não apresentou diferenças significativas, considerando a expressão de RNAm dos TLRs entre os pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Apenas o TLR8 (**Figura 4H**) estava aumentado nos pacientes com a forma clínica cardiodigestiva quando comparado aos pacientes com as formas indeterminada e cardíaca, cerca de 10 vezes mais expressa que nos indivíduos não chagásicos, embora não apresente correlação com os dados clínicos de lesão cardíaca e digestiva (dados não apresentados).

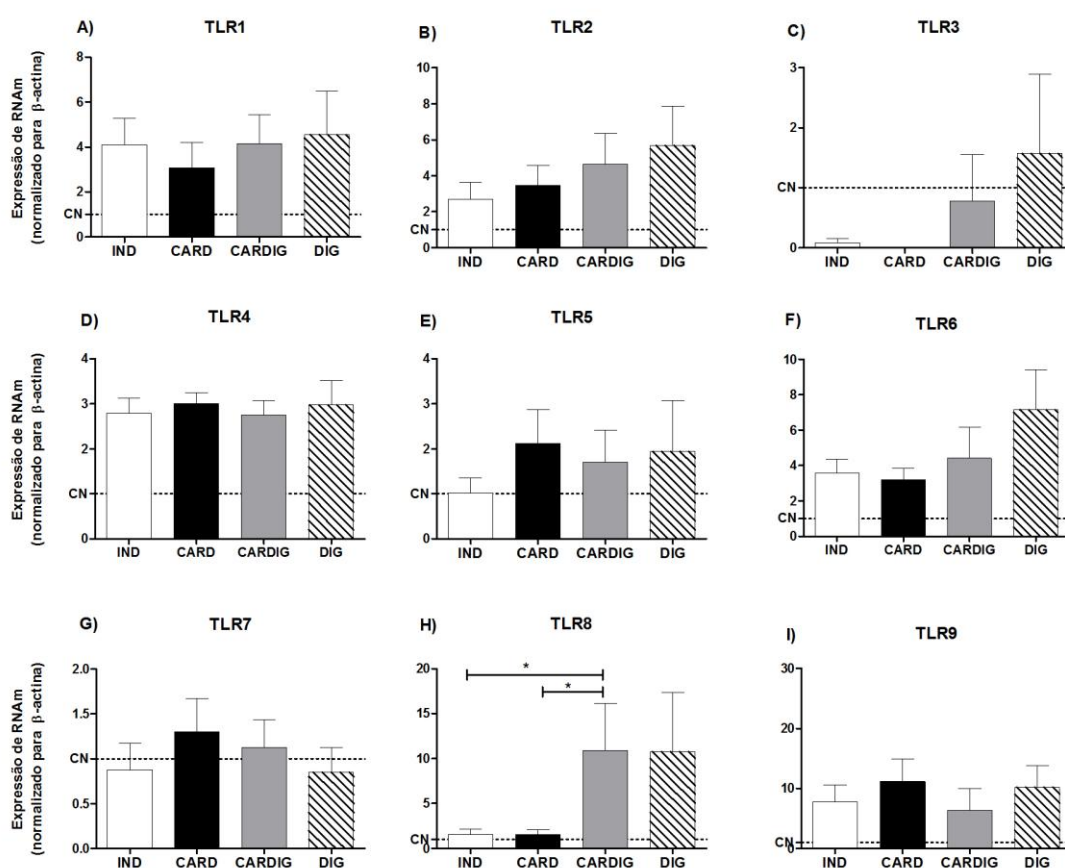


Figura 4. Expressão de RNAm de TLR1 (A), TLR2 (B) e TLR3 (C), TLR4 (D), TLR5 (E), TLR6 (F), TLR7 (G), TLR8 (H) E TLR9 (I) determinadas por PCR em tempo real a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença de Chagas crônica. Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm DP. CN: Controle Negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica).

O TLR9 apesar de não apresentar diferença na expressão de RNAm entre as diferentes formas clínicas, também apresentou-se cerca de 10 vezes mais expresso em pacientes chagásicos, quando comparados com indivíduos não infectados.

Em seguida, analisamos as moléculas adaptadoras responsáveis pelas vias de sinalização dos TLRs, demonstrando que houve uma maior expressão de RNAm para Myd88 no grupo de pacientes com a forma clínica cardiodigestiva quando comparada aos pacientes com as formas indeterminada e cardíaca (**Figura 5A**). Não houve diferença significativa na expressão de RNA mensageiro da molécula adaptadora TRIF dos pacientes independentemente da forma clínica da doença de Chagas (**Figura 5B**).

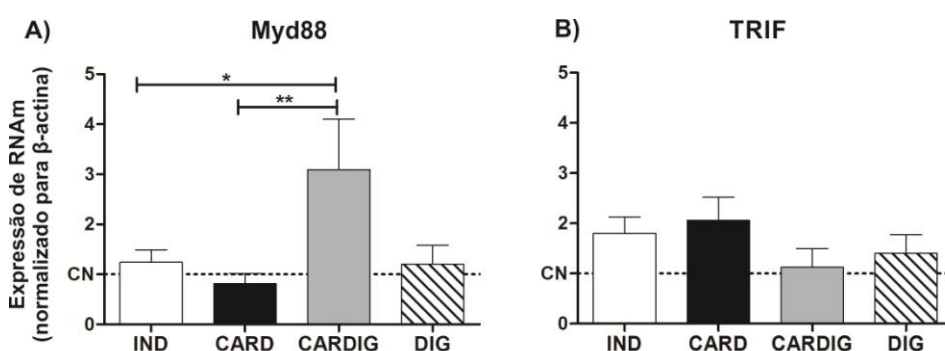


Figura 5. Expressão de RNAm de Myd88 (A) e TRIF (B) determinadas por PCR em tempo real a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença. Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm DP. CN: Controle Negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica) * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Posteriormente, foi verificada a análise da expressão de RNAm para as citocinas produzidas por células apresentadoras de antígenos após inferir a infecção *in vivo*, obtendo-se uma maior expressão de IL-1 β (**Figura 6A**) e IL-12 (**Figura 6B**) em pacientes com a forma clínica cardíaca comparados aqueles com a forma indeterminada da doença. No entanto, não foi observada diferença entre a expressão de IL-18 (**Figura 6C**), IL-6 (**Figura 6D**) e IFN- α (**Figura 6E**) em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Também verificamos a expressão de RNAm dos receptores citoplasmáticos NOD1 e NOD2 e a molécula adaptadora RIP2, importante nessa via de sinalização. Os resultados da expressão dos receptores citoplasmáticos NOD1 e NOD2 e a molécula adaptadora RIP2

demonstraram que não houve diferença significativa entre as formas clínicas quando avaliados o receptor NOD1 (**Figura 7A**). Entretanto, quando analisada a expressão de RNAm do receptor NOD2 foi observada ausência ou expressão reduzida no grupo de pacientes com a forma digestiva comparada ao grupo de pacientes com a forma indeterminada (**Figura 7B**). Já a molécula adaptadora RIP2, que faz parte da via do NOD2, apresentou expressão elevada de RNAm nos pacientes com a forma digestiva comparada aos pacientes com a forma indeterminada da doença mostrando uma expressão inversamente proporcional ao seu receptor (**Figura 7C**).

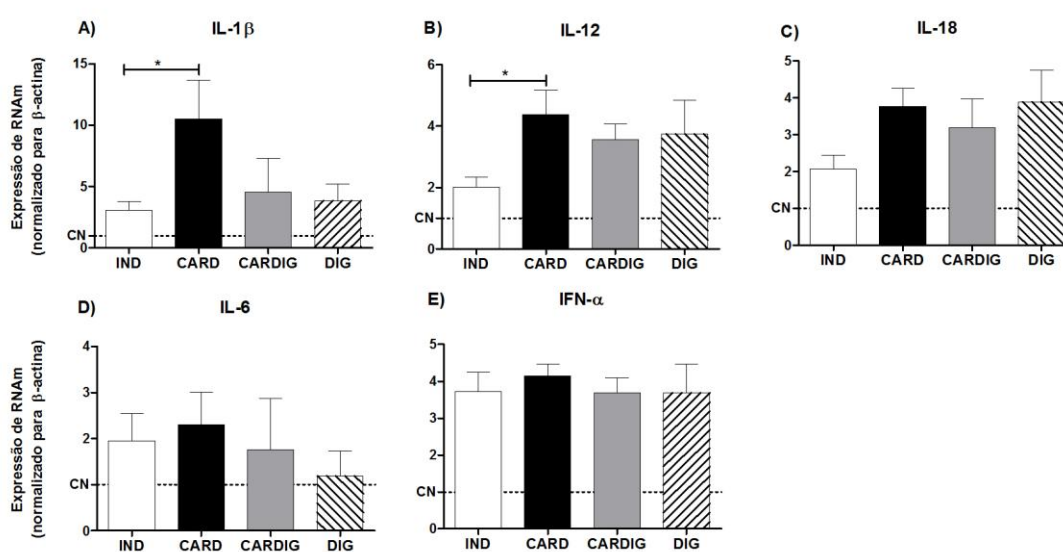


Figura 6. Expressão de RNAm de IL-1 β (A), IL-12 (B), IL-18 (C), IL-6 (D) e IFN- α (E) determinadas por PCR em tempo real a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença de Chagas crônica. Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm DP. CN: Controle Negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica).

A expressão de RNAm para α -defensina 5 foi avaliada e não houve diferença entre os pacientes com as diferentes formas clínicas da doença (**Figura 8A**). Entretanto, foi surpreendente a expressão elevada do RNAm para α -defensina 6 (**Figura 8B**) nos pacientes com a forma clínica digestiva comparada aos pacientes com as formas indeterminada e cardiodigestiva.

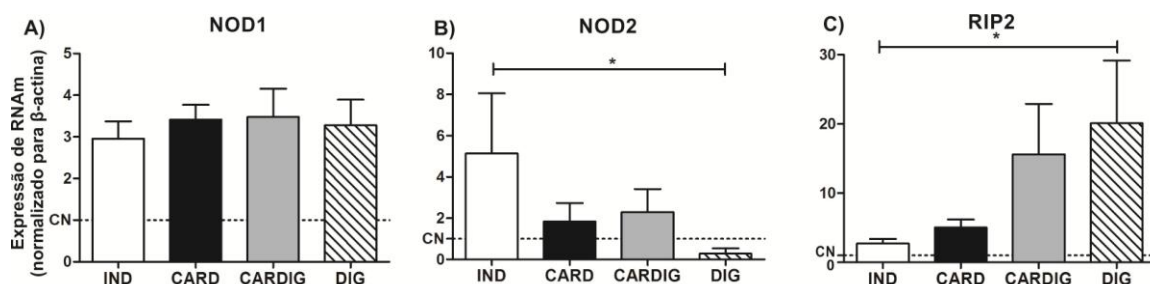


Figura 7. Expressão de RNAm de NOD1 (A), NOD2 (B) e RIP2 (C) determinadas por PCR em tempo real a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença de Chagas crônica. Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm o desvio padrão (DP). CN: Controle negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica) * $p \leq 0,05$.

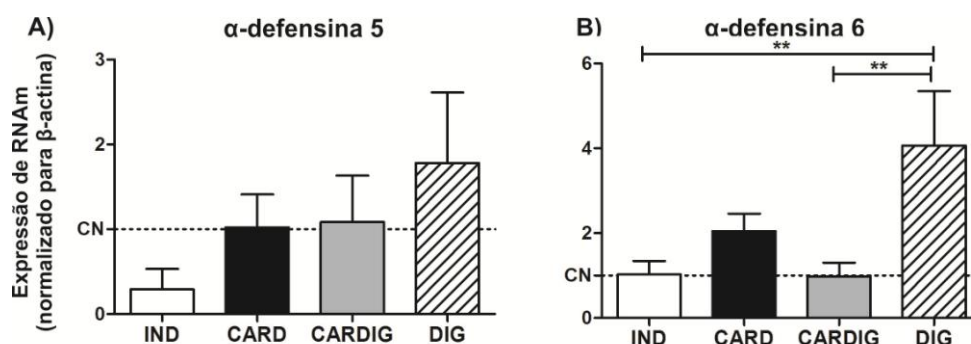


Figura 8. Expressão de RNAm de α -defensina 5 (A) e α -defensina 6 (B) determinadas por PCR em tempo real a partir de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas clínicas indeterminada (n=18), cardíaca (n=17), digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença. Os dados são representativos de experimentos independentes e expressos em média \pm DP. CN: Controle negativo (indivíduos saudáveis provenientes da mesma região geográfica) * $p \leq 0,05$.

Apesar da maior expressão de RNAm para Myd88 em pacientes com a forma clínica cardiodigestiva da doença de Chagas, não foi observada correlação dessa molécula com os parâmetros clínicos avaliados (fração de ejeção do ventrículo esquerdo, índice cardiotorácico, grau de dilatação do esôfago, cólon, sigmoide e reto).

Dentre as citocinas analisadas, observamos maior expressão de RNAm para IL-1 β e IL-12 em pacientes com a forma clínica cardíaca da doença de Chagas, estas citocinas estão possivelmente associadas à hipertrofia cardíaca. Entretanto, não foi observada correlação entre a expressão de IL-1 β e o índice cardiotorácico ou a fração de ejeção do

ventrículo esquerdo (FEVE). A correlação entre a expressão de RNAm de IL-12 também foi elevada em pacientes com a forma clínica cardíaca da doença, sendo observada correlação negativa entre a expressão de IL-12 e a FEVE (**Figura 9A**) indicando que esta citocina pode estar relacionada à gravidade da doença cardíaca, porém, sem correlação com o índice cardiorádico (**Figura 9B**). Não foi observada diferença entre a correlação das interleucinas IL-1 β , IL-12 e Myd88, molécula adaptadora responsável na via de sinalização dessas citocinas, assim como entre os receptores TLRs.

Quanto ao receptor NOD2, a redução ou ausência na sua expressão em pacientes com a forma clínica digestiva da doença de Chagas corroboram com os dados dos pacientes com formas digestiva e cardiodigestiva que apresentaram a expressão de NOD2 correlacionada ao grau de dilatação do megaesôfago e correlação negativa entre a expressão de NOD2 e o grau de dilatação do esôfago (**Figura 9C**). O mesmo padrão foi verificado para pacientes que apresentaram megacólon e a correlação foi negativa entre a expressão de NOD2 e a dimensão do sigmoide (**Figura 9D**), não sendo observada correlação entre o grau de dilatação do reto e a expressão de NOD2 (dados não apresentados). Esta correlação reforça a importância da ausência ou baixa expressão de NOD2 nos pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas. A correlação entre a expressão de RNAm de RIP2 e o grau de dilatação do esôfago, sigmoide e reto, mostrou correlação positiva entre essa molécula e o grau de dilatação do reto (**Figura 9E**) e sigmoide (**Figura 9F**) e não houve correlação entre a expressão de RIP2 e o grau de dilatação do esôfago. Não foi verificada correlação entre a expressão de RNAm e os receptores NOD2 e sua molécula adaptadora RIP2 (dados não apresentados).

Finalmente, avaliamos a correlação entre a expressão de RNAm de α -defensina 5 e 6 e o grau de dilatação do esôfago, sigmoide e reto de pacientes com a forma digestiva, não sendo observada correlação entre a expressão de α -defensinas e o grau de dilatação das diferentes áreas do trato digestivo. A correlação das α -defensinas com a molécula adaptadora RIP2 e o receptor NOD2 também não apresentou diferença (dados não apresentados).

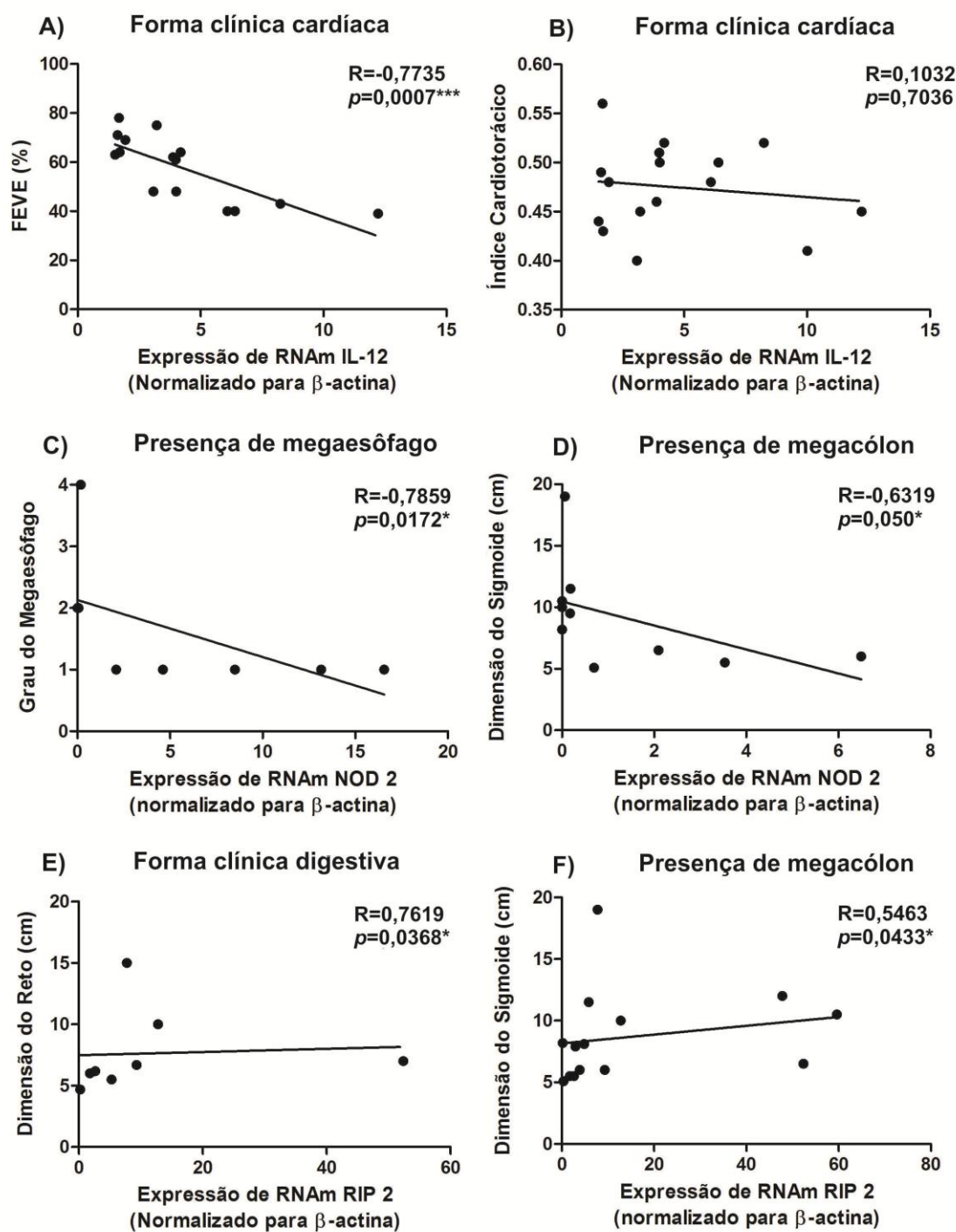


Figura 9. Correlação entre a expressão de RNAm, determinada por PCR em tempo real, entre IL-12 e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (A); IL-12 e o índice cardiotorácico (B) de pacientes com a forma clínica cardíaca (n=17); NOD2 com megaesôfago (C) e megacólon -sigmoide (D), RIP2 com reto (E) e megacólon-sigmoide (F) de pacientes com as formas digestiva (n=9) e cardiodigestiva (n=10) da doença de Chagas crônica * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi avaliada a expressão de RNAm dos receptores da imunidade inata (TLRs e NLRs), suas moléculas adaptadoras (Myd88, TRIF e RIP2), citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 e IFN- α) e α -defensinas (5 e 6) em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Foi observado que pacientes que apresentam a forma cardiodigestiva da doença tem elevada expressão de RNAm do receptor TLR8 e sua molécula adaptadora Myd88. Pacientes que apresentam a forma cardíaca da doença de Chagas apresentaram maior expressão de RNAm das citocinas IL-1 β e IL-12. E, pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas apresentam expressão reduzida ou ausente de RNAm do receptor NOD2 e expressão de RNAm de RIP2 e α -defensina 6 aumentada, sugerindo associação com a lesão no trato gastrointestinal.

Não houve diferença na expressão de RNAm dos TLRs em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas, exceto para o TLR8 e a molécula adaptadora TRIF, que faz parte da via de sinalização dos TLRs 3 e 4. O RNAm de TLR8 apresentou-se mais expresso em pacientes com a forma cardiodigestiva quando comparado aos pacientes com as formas indeterminada e cardíaca. Dados da literatura têm demonstrado que a sinalização via TLRs é importante no mecanismo de controle das infecções pelos protozoários *T. cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. e *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli & Denkers 2006). Recentemente o papel do TLR8 tem sido descrito nas doenças inflamatórias intestinais, como colite ulcerativa e doença de *Crohn*, tendo sua expressão aumentada no epitélio colônico de pacientes com doenças inflamatórias intestinais. Esses dados sugerem sua função na susceptibilidade às doenças inflamatórias no trato digestivo, podendo estar associada à lesão no trato digestivo dos pacientes chagásicos, como descrito nos pacientes com a forma cardiodigestiva da doença de Chagas (Saruta *et al.* 2009; Steenholdt *et al.* 2009).

O desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica tem sido associado ao desequilíbrio na resposta imunológica do paciente, uma vez que os pacientes que apresentam esta lesão produzem elevada expressão de IFN- γ e TNF- α associada a baixos níveis de produção de IL-10 e IL-17 (Corrêa-Oliveira *et al.* 1999; Ribeirão *et al.* 2000; Abel *et al.* 2001; Gomes *et al.* 2003, Guedes *et al.* 2012; Magalhães *et al.* 2013; Sousa *et al.* 2014). Embora a maior parte das citocinas produzidas durante a infecção pelo *T. cruzi* responsáveis pelo dano cardíaco sejam provenientes de uma resposta derivada de macrófagos e linfócitos T, moléculas presentes no parasito (PAMPs), como as âncoras de

GPI, GIPL, ácidos nucleicos, são reconhecidas via TLR2, TLR4, TLR7, TLR9 (Campos *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2004; Koga *et al.* 2006; Caetano *et al.* 2011) e, seriam responsáveis pela constante reestimulação do sistema imunológico, levando ao aumento ou até mesmo à manutenção da elevada produção de citocinas do perfil Th1, responsáveis pelo dano cardíaco. Entretanto, neste estudo não foi demonstrada expressão elevada de TLRs e suas moléculas adaptadoras em pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas. Poucos trabalhos têm analisado o envolvimento dos receptores da imunidade inata no desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica. Dados recentes têm demonstrado que pacientes chagásicos heterozigóticos para a variante MAL/S180L TIRAP que apresentam redução na transdução de sinal pela ligação de TLR2 e TLR4 e o respectivo ligante, tem menor risco de desenvolver CCC (Ramasawmy *et al.* 2009). Por outro lado, estudos utilizando células cardíacas de murinos têm demonstrado o papel do receptor TLR2 e sinalização de NF-KB, na indução da hipertrofia de cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi* (Petersen *et al.* 2005).

O aumento da expressão de RNAm de Myd88, importante molécula envolvida na via de sinalização dos TLRs, foi detectado em pacientes com a forma cardiodigestiva da doença de Chagas. Trabalhos que avaliaram a ação de Myd88 sobre o epitélio intestinal e a diversidade da microbiota do trato digestivo em camundongos, demonstraram que a homeostase na produção desta molécula é importante para manutenção da integridade do epitélio (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004; Gibson *et al.* 2008), além de controlar a diversidade e quantidade de bactérias no duodeno, jejuno e íleo (Larsson *et al.* 2012). Estudos com camundongos deficientes dessa molécula demonstraram a importância do Myd88 em controlar a parasitemia e mortalidade dos animais infectados com a cepa Y, sendo importante na produção de citocinas pró-inflamatórias e na resistência a infecção pelo *T. cruzi* (Campos *et al.* 2004). Desta forma especula-se que a elevada expressão de RNAm de Myd88 pode estar relacionado à maior inflamação cardíaca, derivada de maior ativação dos TLRs, bem como pela penetração de bactérias no epitélio intestinal promovendo também maior estimulação dos receptores da imunidade inata, como o TLR8, que também apresenta-se elevado nos pacientes com a forma cardiodigestiva da doença de Chagas.

Após a análise da expressão dos TLRs e suas moléculas adaptadoras, decidimos avaliar a expressão de RNAm das citocinas dos pacientes com as diferentes formas clínicas. A expressão de RNAm para IL-1 β esteve aumentada nos pacientes com a forma cardíaca, resultados semelhantes àqueles que avaliaram a ação dessa citocina em pacientes

chagásicos com a forma cardíaca da doença. A ação desta citocina está relacionada com a hipertrofia cardíaca e inibição da proliferação de fibroblastos, indicando o seu papel no remodelamento cardíaco (Patten *et al.* 1996; Lachtermacher *et al.* 2010; Sousa *et al.* 2014). Sua ação também foi avaliada em cultura de cardiomiócitos murinos infectados pelo *T. cruzi*, sendo observado que a suplementação com IL-1 β , TNF- α e IFN- γ reduz o parasitismo celular, pelo aumento da produção de óxido nítrico, demonstrando que as células cardíacas atuam diretamente na resposta contra o parasito, sendo também responsáveis pelo remodelamento tecidual e hipertrofia cardíaca (Postan *et al.* 1999).

Os pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas analisados apresentaram elevada expressão de RNAm para IL-12, sendo ainda mais elevada naqueles pacientes que apresentam menor fração de ejeção do ventrículo esquerdo, corroborando com dados na literatura que associam a produção desta citocina com a forma grave da doença cardíaca (Dutra *et al.* 1996; Corrêa-Oliveira *et al.* 1999; Ribeirão *et al.* 2000; Abel *et al.* 2001; Gomes *et al.* 2003, Cardoso *et al.* 2006; Sousa *et al.* 2014). O IFN- γ , produto da indução de IL-12 por macrófagos, também se encontra aumentado em pacientes com a forma cardíaca e apresentam correlação negativa com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Guedes *et al.* 2012).

A avaliação do receptor NOD1 demonstrou que não há diferença entre a expressão desse receptor e as formas clínicas dos pacientes, embora o papel desse receptor esteja bem definido em murinos no reconhecimento inicial do parasito e resistência na infecção experimental pelo *T. cruzi* e pela ação independente da produção de citocinas (Silva *et al.* 2010). Por outro lado, quando analisada a expressão do receptor NOD2 observamos sua redução ou completa ausência em pacientes com a forma clínica digestiva da doença de Chagas, comparado àqueles pacientes que apresentam a forma indeterminada. Somado a isso, os pacientes com a forma digestiva da doença, apresentaram elevada expressão de RNAm para RIP2, podendo seu aumento estar relacionado a compensação devido a ausência de seu receptor, o NOD2. A serina-treonina quinase RICK ou RIP2 é recrutada após a ativação de NOD, levando à translocação de NF-kB para o núcleo (Uematsu & Akira 2006). Desta forma, verificamos que além da elevada expressão de RIP2, houve correlação dessa molécula com lesões no megacólon dos pacientes, corroborando com os resultados obtidos para seu receptor (NOD2) e a correlação com a forma clínica digestiva da doença de Chagas.

Mutações em NLRs têm sido atualmente relacionadas a uma variedade de doenças inflamatórias, sendo consistentes com a ação dessas moléculas na interação patógeno-hospedeiro na resposta inflamatória. Estudos recentes têm correlacionado o papel de NOD2 com a doença de *Crohn*, uma desordem inflamatória crônica do trato gastrointestinal caracterizada por inflamação transmural no intestino e no íleo distal (Hisamatsu *et al.* 2003). Múltiplas variantes de NOD2 têm sido associadas à doença de *Crohn*, sendo três importantes desses polimorfismos relacionados ao fator de risco que induz a ausência ou reduzida expressão desse receptor. Altamente expresso nas células de *Paneth*, o receptor NOD2 é responsável pela regulação da microbiota ilíaca por componentes antimicrobianos (Franchi *et al.* 2009; Biswas *et al.* 2012). Estudos utilizando camundongos deficientes desse receptor verificaram que esta molécula influencia na constituição da microbiota intestinal, em que sua ausência favorece o aparecimento de bactérias patogênicas, além de aumentar consideravelmente a carga bacteriana nas fezes e no íleo terminal, com maior tendência a penetração no epitélio intestinal e geração de colite severa nesses animais (Hisamatsu *et al.* 2003; Natividad *et al.* 2012). Também foi demonstrado que NOD2 influencia a composição microbiana em humanos, o que pode estar contribuindo na patogenia da doença de *Crohn* (Rehman *et al.* 2011) e possivelmente na forma digestiva da doença de Chagas crônica.

Camundongos nocautes de NOD2 e pacientes com doença de *Crohn* que apresentam a mutação para NOD2, tem reduzida expressão de α -defensinas (5 e 6), embora a redução dessas defensinas ocorram independente das mutações (Wehkamp *et al.* 2004). Devido à redução ou ausência na expressão de NOD2 em pacientes com a forma digestiva, posteriormente decidimos avaliar a expressão de RNAm dessas moléculas. As α -defensinas são peptídeos antimicrobicidas predominantemente expressos nas células de *Paneth* no íleo, após o reconhecimento de constituintes bacterianos (MDP-muramildipeptídeo) por NOD2, na tentativa de controlar a penetração destas bactérias na parede do trato digestivo (Ganz & Lehrer 1994; Schroder 1999, Cunliffe 2003).

Foi observada maior expressão de RNAm para α -defensina 6 em pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas, indicando uma maior estimulação de sua produção após penetração de bactérias no epitélio do trato digestivo. O aumento na expressão de α -defensinas tem sido descrito em pacientes com infecções parasitárias (Cunliffe & Mahida 2004). Sendo assim, o receptor NOD2 reconhece MDP, substância presente em bactérias, que induz a atividade bactericida nas criptas e promove a regulação da microbiota

intestinal. Da mesma forma, as bactérias comensais controlam a expressão de NOD2 e RIP2, fazendo com que o receptor de NOD2 funcione como uma chave reguladora da microbiota intestinal, podendo influenciar as doenças inflamatórias crônicas no trato gastrointestinal. Animais *germ free*, expressam baixos níveis de NOD2 no íleo terminal, corroborando no papel da microbiota, na regulação da expressão do receptor (Biswas *et al.* 2012; Jiang *et al.* 2013).

Dados recentes avaliaram o papel da microbiota em muitas funções fisiológicas e imunidade contra patógenos, em que alterações na composição da microbiota têm sido cada vez mais correlacionadas à contribuição no desenvolvimento de várias doenças crônicas e inflamatórias (Lin *et al.* 2014). A doença de Chagas também é uma doença crônica e inflamatória, com lesões do trato gastrointestinal ocorrendo predominantemente no esôfago e no cólon, estas lesões anatomopatológicas de base correspondem a denervação parassimpática intramural particularmente, o plexo mioentérico do sistema nervoso autônomo (Tafuri & Raso 1983; Andrade *et al.* 2000; Rezende & Moreira 2000). A presença do parasito no tecido esofágico é marcadamente comprovada, mesmo em pacientes que não apresentam o quadro de megaesôfago, assim como em pacientes com diferentes estágios da forma digestiva. A tal fato, associam-se outros fatores importantes na patogenia da doença que não exclusivamente a presença do parasito no tecido (Vago *et al.* 1996; Vago *et al.* 2000; Lages-Silva *et al.* 2001; Vago *et al.* 2003; Lages-Silva *et al.* 2006). Desta forma, o parasito além de poder causar a lesão tecidual, pode agir juntamente com outros fatores da resposta imune do hospedeiro. No entanto, tais mecanismos ainda não estão bem elucidados na forma digestiva da doença de Chagas (Lemos *et al.* 1998; Teixeira *et al.* 2002; Gomes *et al.* 2003).

Além de considerar a lesão de base causada pelo parasito e sua presença no tecido, a redução da atividade de NOD2 expõe ainda mais a mucosa à ação invasiva da microbiota no hospedeiro, influenciando na resposta inflamatória mais intensa na mucosa do trato gastrointestinal. As lesões no trato digestivo são causadas pela denervação do tecido e disfunções motoras, que levam ao acúmulo de alimentos e fezes no lúmen (Tafuri *et al.* 1971), com considerável envolvimento nervoso entérico, redução de neurônios e fibras nervosas, e progressiva fibrose (Adad *et al.* 2001, da Silveira *et al.* 2005; da Silveira *et al.* 2007).

O desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas parece também estar relacionada com a distribuição geográfica de diferentes subpopulações do *T. cruzi*

(Zingales *et al.* 1998, Prata 2001, Virreira *et al.* 2006), mas indivíduos que apresentam a variante que predispõe a baixa expressão de NOD2, pode também ter correlação com o desenvolvimento da forma digestiva da doença, envolvendo participação de fatores inerentes ao parasito. Desse modo, sugerimos que o receptor da imunidade inata NOD2, apresenta importante função na gênese das lesões do trato digestivo de pacientes chagásicos.

Temos como hipótese, que se faz necessário uma cepa do *T. cruzi* com tropismo pelo trato intestinal e, esta cepa poderá gerar uma inflamação inicial promovendo a quebra da homeostase do sistema digestivo, onde temos a presença de muco e IgA que impedem a penetração de bactérias na camada epitelial do trato digestivo. Após a geração desta inflamação inicial pelo parasito, ocorrerá a penetração de bactérias na lâmina própria, em pacientes com expressão de NOD2 ausente ou reduzida, facilitando a colonização deste ambiente pelas bactérias e amplificando a inflamação local iniciada pelo parasito. Soma-se a isto, o fato de pacientes com ausência na expressão de NOD2 apresentarem microbiota intestinal com bactérias patogênicas (Rehman *et al.* 2011), comparado aqueles pacientes com expressão normal deste receptor. A inflamação é responsável pela denervação do trato intestinal e perda gradativa do peristaltismo, com o decorrer do processo patológico começará a ocorrer acúmulo de material no trato intestinal que iniciará a compressão das vísceras gerando também patologias isquêmicas que irão amplificar o processo de formação das “mega” síndromes (megaesôfago e megacolon).

7 CONCLUSÕES

- ✓ Os níveis de expressão do RNA mensageiro dos *Toll Like Receptors* (TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9) e da molécula adaptadora TRIF (*Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β*) não apresentaram diferença entre os pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas;
- ✓ Os pacientes com a forma clínica cardiodigestiva da doença de Chagas, apresentaram elevada expressão de RNAm do receptor *Toll Like Receptor 8* e de sua molécula adaptadora *Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88* (Myd88);
- ✓ Os pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas apresentaram elevada expressão do RNA mensageiro das interleucinas IL1- β e IL-12 comparado aos pacientes com a forma indeterminada da doença;
- ✓ A correlação entre a expressão de RNA mensageiro para IL-12 e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foi inversa em pacientes com a forma clínica cardíaca da doença de Chagas;
- ✓ Não houve diferença entre os níveis de expressão de RNA mensageiro para o receptor *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1* (NOD1) entre os pacientes com as formas clínicas indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas;
- ✓ O receptor NOD2 (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2*) apresentou expressão reduzida ou ausente em pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas. Enquanto sua molécula adaptadora RIP2 (*Receptor-interacting protein kinase 2*) apresentou expressão elevada nesses pacientes.
- ✓ A expressão de RNA mensageiro para o receptor *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2* (NOD2) mostrou correlação inversa ao grau de dilatação do esôfago e do sigmoide em pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas;
- ✓ Os pacientes com a forma clínica digestiva da doença de Chagas apresentaram elevada expressão da substância antimicrobica α -defensina 6, que é produzida principalmente nas células de *Paneth*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E 2001. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun* 17: 99-107.
- Abrahamsohn IA, Coffman RL 1996. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma and IL-12 regulate innate and acquired immunity infection. *Exp Parasitol* 84: 231-44.
- Adad SJ, Cançado CG, Etchebehere RM, Teixeira VPA, Gomes UA, Chapadeiro E, Lopes ER 2001. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch* 438:254-58.
- Akashi-Takamura S, Miyake K 2008. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 20: 420-25.
- Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS 1996. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 64: 1961-7.
- Anabel AS, Eduardo PC, Antonio HCP, Carlos SM, Juana NM, Honorio TA, Nicolás VS, Roberto ARS 2014. Human platelets express Toll-Like Receptor 3 and respond to poly I:C. *Hum Immunol* S0198-8859(14)00443-1.
- Andrade SG, Campos RF, Sobral SC, Magalhães JB, Guedes RSP, Guerreiro ML 2006. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myosites in mice. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 1-8.
- Andrade ZA 2000. Patologia da doença de Chagas. In: Brener Z; Andrade ZA. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 201-30.
- Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramirez JL 1999. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg* 60: 726-32.
- Báfica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Dszmid RG, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A 2006. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for Myd88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 177: 3515-19.
- Bartholomeu DC, Ropert C, Melo MB, Parroche P, Junqueira CF, Teixeira SMR, Sirois C, Kasperkovitz P, Knetter CF, Lien E, Latz E, Golenbock DT, Gazzinelli RT 2008.

- Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 181: 1333-44.
- Bellotti G, Bocchi EA, de Moraes AV, Higuchi ML, Barbero-Marcial M, Sosa E, Esteves-Filho A, Kalil R, Weiss R, Jatene A, Pileggi F 1996. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in heart of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J* 131: 301-307. *Erratum in Am Heart J* 1998 135: 550.
- Biswas A, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS 2012. Nod2: A key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl)* 90: 15-24.
- Brasil 2005. Secretaria de Vigilância em Saúde: Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (suppl. III): 1-29.
- Brito CRN, Sampaio GHF, Câmara ACJ, Nunes DF, Azevedo PRM, Chiari E, Galvão LMC. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection in the semiarid rural zone of the State of Rio Grande do Norte, Brazil 2012. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 346-52.
- Buckner FS, Wipke BT, Van Voorhis WC 1997. *Trypanosoma cruzi* infection does not impair major histocompatibility complex class I presentation of antigen to cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 27: 2541-8.
- Caetano BC, Carmo BB, Melo MB, Cerny A, dos Santos SL, Bartholomeu DC, Golenbock DT, Gazzinelli RT 2011. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 187: 1903-11.
- Camargo ME 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 8: 227-35.
- Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, Ropert C, Gazzinelli RT. 2004. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 172: 1711-18.
- Cardoso GM, Morato MJF, Gomes JAS, Rocha MOC, Bonfim IP, Williams-Blangero S, VandeBerg JL, Reis MR, Magalhães EFL, Correa-Oliveira R 2006. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. *Front Biosci* 11:1158-63.

- Chagas C 1909. Nova trypanozomíase humana. Estudo sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, N. Gen, N. sp., o agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chagas C 1916. Tripanosomiase Americana. Forma aguda da moléstia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 8: 37-65.
- Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da Trypanosomiase Americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 14: 5-61.
- Corrêa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S, Crema E, Martins-Filho OA, Costa MO, Gazzinelli G, Bahia-Oliveira LM 1999. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 253-5
- Cossio PM, Diez C, Szarfman A, Kreutzer E, Candiolo B, Arana RM 1974a. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation* 49:13-21.
- Cossio PM, Laguens RP, Diez C, Szarfman A, Segal A, Arana RM 1974b. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation* 50:1252-59.
- Coura JR 1988. Determinantes epidemiológicos da doença de Chagas no Brasil: a infecção, a doença e sua morbi-mortalidade. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83 (Suppl.1) :392-402.
- Coura JR, Borges-Pereira J 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 115:5-13.
- Cunliffe RN 2003. Alpha-defensins in the gastrointestinal tract. *Mol Immunol* 40: 463-7.
- Cunliffe RN, Mahida YR 2004. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J Leukoc Biol* 75:49-58.
- da Silveira ABM, Arantes RME, Vago AR, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, D'Avila Reis D 2005. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology* 131: 627-34.
- da Silveira ABM, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila-Reis D 2007. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves and glial cells. *Hum Pathol* 38: 1256-64.
- Dias JCP 1995. Natural history of Chagas disease. *Arq Bras Cardiol* 65: 359-66.

- Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Pinto Dias JC, Brener Z, Freeman Junior GL, Colley DG, Gazzinelli G, Parra JC 1994. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol* 6: 499-506.
- DutraWO, da Luz ZM, Cançado JR, Pereira ME, Brigido-Nunes RM, Galvão LM, Colley DG, Brener Z, Gazzinelli G, Carvalho-Parra JF 1996. Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from chagasic patients after specific drug therapy. *Parasite Immunol* (11): 579-85.
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G 2009. Function of Nod -like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 277: 106-28.
- Ganz T, Lehrer RI 1994. Defensins. *Curr Opin Immunol* 6:584–89.
- Gazzinelli RT, Denkers EY 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 6:895-906.
- Gibson DL, Ma C, Bergstrom KS, Huang JT, Man C, Vallance BA 2008. MyD88 signalling plays a critical role in host defence by controlling pathogen burden and promoting epithelial cell homeostasis during *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Cell Microbiol* 10: 618-31.
- Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R 2003. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 71:1185-93.
- Guedes PMM, Gutierrez FRS, Silva GK, Dellalibera-Joviliano R, Rodrigues GJ, Bendhack LM, Rassi Jr A, Rassi A, Schmidt A, Maciel BC, Marin Neto JA, Silva JS 2012. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6 :e1630.
- Hayden MS, Ghosh S 2004. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev* 18: 2195-2224.
- Higuchi ML 1995. Chagas disease. Importance of parasite in the pathogenesis of the cardiac chronic disease. *Arq Bras Cardiol* 64: 251-54.
- Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK 2003. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124:993-1000.
- Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossman H, Schaub GA, Brombacher F 1998. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-

- infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 66:1208-15.
- Jiang W, Wang X, Zeng B, Liu L, Tardivel A, Wei H, Han J, MacDonald HR, Tschopp J, Tian Z, Zhou R 2013. Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Exp Med* 210: 2465-76. *Erratum in J Exp Med* 2013 210: 2791.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL 1993. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 48: 348-57.
- Kawai T, Akira S 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat immunol* 11: 373-84.
- Kayama H, Takeda K 2010. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 12: 511-7.
- Koga R, Hamano S, Kuwata H, Atarashi K, Ogawa M, Hisaeda H, Yamamoto M, Akira S, Himeno K, Matsumoto M, Takeda K 2006. TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 177: 7059-66.
- Lachtermacher S, Esporcatte BL, Montalvão F, Costa PC, Rodrigues DC, Belem L, Rabischoffsky A, Faria Neto HC, Vasconcellos R, Iacobas S, Iacobas DA, Dohmann HF, Spray DC, Goldenberg RC, Campos-de-Carvalho AC 2010. Cardiac gene expression and systemic cytokine profile are complementary in a murine model of post-ischemic heart failure. *Braz J Med Biol Res* 43: 377-89.
- Lages-Silva E, Crema E, Ramirez LE, Macedo AM, Pena SD, Chiari E 2001. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and Human Chagasic megaesophagus: Blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 65: 435-41.
- Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, Galvão LMC, Pena SD, Macedo AM, Chiari E 2006. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol* 44: 2167-71.
- Larsson E, Tremaroli V, Lee YS, Koren O, Nookaew I, Fricker A, Nielsen J, Ley RE, Bäckhed F 2012. Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *Gut* 61: 1124-31.

- Lemos EM, D'ávila Reis D, Adad SJ, Silva GC, Crema E, Correa-Oliveira R 1998. Decreased CD4(+) circulating T lymphocytes in patients with gastrointestinal Chagas disease. *Clin Immunol Immunopathol* 88: 150-5.
- Lin CS, Chang CJ, Lu CC, Martel J, Ojcius DM, Ko YF, Young JD, Lai HC 2014. Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. *Biomed J* doi: 10.4103/2319-4170.138314.
- Macedo AM, Pena SDJ, 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today* 14:119–124.
- Magalhães LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO 2013. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis* 207: 661-5.
- Magarino-Torres C 1929. Patogenia de la miocardite cronica de la "enfermedad de Chagas". *Quinta Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional do Norte* 2: 902-16.
- Mariano FS, Gutierrez FRS, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira AP, Ferreira BR, Cunha FQ, Cardoso CR, Silva JS 2008. The involvement of CD4+ CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect* 10: 825-33.
- Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos AN Jr, Heukelbach J 2012a. Epidemiology of Mortality Related to Chagas' Disease in Brazil, 1999–2007. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1508.
- Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J 2014. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop* 130: 167-74.
- Martins-Melo FR, Rogerlândio F, Ramos Jr, Novaes A, Heukelbach J 2012b. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. *J Infect Dev Ctries* 6: 817-24.
- McDonald C, Inohara N, Nuñez G 2005. Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J Biol Chem* 280: 20177-80.
- Natividad JMM, Petit V, Huang X, de Palma G, Jury J, Sanz Y, Philpott D, Garcia Rodenas CL, McCoy KD, Verdu EF 2012. Commensal and probiotic bacteria influence intestinal barrier function and susceptibility to colitis in Nod1^{-/-};Nod2^{-/-} mice. *Inflamm Bowel Dis* 18: 1434-46.

- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nuñez G 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-KappaB. *J Biol Chem* 276: 4812-18.
- Oliveira AC, de Alencar BC, Tzelepis F, Klezewsky W, da Silva RN, Neves FS, Cavalcanti GS, Boscardin S, Nunes MP, Santiago MF, Nóbrega A, Rodrigues MM, Bellio M 2010. Impaired innate immunity in Tlr4 (-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. *PLoS Pathog* 6: e1000870.
- Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, Akira S, Previato JO, Mendonça-Previato L, Nobrega A, Bellio M 2004. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 173: 5688-96.
- Ostermayer AL, Passos ADC, Silveira AC, Ferreira AW, Macedo V, Prata AR. The national survey of seroprevalence for evaluation of the control of Chagas disease in Brazil (2001-2008) 2011. *Rev Soc Bras Med Trop* 44 (Suppl 2): 108-21.
- Patten M, Hartogensis WE, Long CS 1996. Interleukin-1beta is a negative transcriptional regulator of alpha1-adrenergic induced gene expression in cultured cardiac myocytes. *J Biol Chem* 271: 21134-41.
- Petersen CA, Krumholz KA, Burleigh BA 2005. Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1beta-dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 73: 6974-80.
- Postan M, Arnaiz MR, Fichera LE 1999. Myocardial cell response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Medicina (B Aires)* 59 (Suppl. 2): 57-62.
- Prata A 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1: 92-100.
- Proell M, Riedl SJ, Fritz JH, Rojas AM, Schwarzenbacher R 2008. The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS One* 3: e2119.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118 (2): 229-41.
- Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, Borba SCP, Teixeira PC, Ferreira SCP, Goldberg AC, Ianni B, Mady C, Kalil J 2009. Heterozygosity for the S180L variant os

- MAL/TIRAP, a gene expressing an adaptor protein in the Toll-like receptor pathway, is associated with lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis* 199; 1838-45.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA 2010. Chagas disease. *Lancet* 375:1388-402.
- Rehman A, Sina C, Gavrilova O, Häsler R, Ott S, Baines JF, Schreiber S, Rosenstiel P 2011. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial. *Gut* 60:1354-62.
- Rezende JM, Lauer KL, Oliveira AR 1960. Aspectos clínicos e radiológicos da aperistalsis do esôfago. *Rev Bras Gastroenterol* 12: 247-62.
- Rezende JM, Moreira H 2000. Forma digestiva da doença de Chagas. In: Brener Z; Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro Guanabara Koogan 297-343.
- Ribeirão M, Pereira-Chioccola VL, Rénia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM 2000. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol* 22: 49-53
- Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M 2012. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *J Parasitol Res* 2012: 507874.
- Saruta M, Targan SR, Mei L, Ippoliti AF, Taylor KD, Rotter JI 2009. High-frequency haplotypes in the X chromosome locus TLR8 are associated with both CD and UC in females. *Inflamm Bowel Dis* 15: 321-7.
- Schroder JM 1999. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci* 56: 32-46.
- Secretaria de Estado da Saúde-SESAP 2012. Atenção à Saúde com foco na Vigilância Epidemiológica. Relatório de Situação. Rio Grande do Norte 2011. Available from:http://www.portal.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap/saude_destaque/enviados/CADERNO_SAUDE_SUVIGE_2011.pdf
- Silva GK, Gutierrez FRS, Guedes PMM, Horta CV, Cunha LD, Mineo TWP, Santiago-Silva J, Kobayashi KS, Flavell RA, Silva JS, Zamboni DS 2010. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 184: 1148-52.

- Silva JS, Aliberti JC, Martins GA, Souza MA, Souto JT, Pádua MA 1998. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection 1998. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Braz J Med Biol Res* 31: 111-5.
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG 1992. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 175: 169-74.
- Silva JS, Twardzik DR, Reed SG 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med* 174: 539-45.
- Sousa GR, Gomes JAS, Fares RCG, Damásio MPS, Chaves AT, Ferreira KS, Nunes MCP, Medeiros NI, Valente VAA, Corrêa-Oliveira R, Rocha MOC 2014. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PLoS One* 9:e87082.
- Steenholdt C , Andresen L, Pedersen G, Hansen A, Brynskov J 2009. Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 44: 195-204.
- Tafuri WL, Maria TA, Lopes ER 1971. Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 13: 76-91.
- Tafuri WL, Raso P. Anatomia Patológica. In: Raia AA. (ed) Manifestações digestivas da moléstia de Chagas 1983. 1ª edição. *Savier*, São Paulo p.60-79.
- Takeuchi O, Akira S 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-20.
- Tangeras LH, Stødle GS ,Olsen GD, Leknes AH ,Gundersen AS, Skei B,Vikdal AJ, Ryan L, Steinkjer B, Myklebost MF, Langaas M, Austgulen R, Iversen AC 2014. Functional Toll-like receptors in primary first-trimester trophoblasts. *J Reprod Immunol* S0165-0378(14)00056-4.
- Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N 2011. Pathogenesis of Chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev* 24: 592-630.
- Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR 2006. Evolution and pathology in Chagas disease—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 463–491.

- Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS 2002. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* 18: 262-65.
- Uematsu S, Akira S 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Virus* 56: 1-8.
- Uematsu S, Fujimoto K 2010. Review: The innate immune system in the intestine. *Microbiol Immunol* 54: 645–657.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N Jr, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microb* 34: 2143-47.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, D'Ávila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MCV, Filho GB, Pena SDJ 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol* 156:1805-09.
- Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, D'ávila Reis D, Silva GC, Corrêa-Oliveira R 1996. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet* 348: 891-92.
- Vago AR, Silva DM, Adad SJ, Corrêa-Oliveira RE, D'Ávila Reis D 2003. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the esophagus of patients without megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97: 308-9.
- Virreira M, Serrano G, Maldonado L, Svoboda M 2006. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub) lineages in megacolon samples from Bolivian patients. *Acta Trop* 100: 252-55.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53: 1658-64.
- WHO 2014. World Health Organization Chagas' disease (American Trypanosomiasis). fact sheet N°340. Acesso em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- Wilmanski JM, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS 2008. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J Leukoc Biol* 83: 13-30.
- Wirth JJ, Kierszenbaum F 1985. Stimulatory effects of leucotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 134: 1989-93.

- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:1051–1054
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* 28: 105-12.

9 ANEXO



Governo do Estado do Rio Grande do Norte
Secretaria de Estado da Educação e da Cultura - SEEC
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE - UERN
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
Rua Almirante Miguel da Silva Neto, s/n - Aeroporto
Home Page: www.uern.br/cep - e-mail: cep@uern.br - CEP: 59607-360 - Mossoró - RN

PARECER CONSUBSTANCIADO CEP/UERN Nº 027/11

Nº PROTOCOLO (CEP)	027/11
Nº CAAE (SISNEP)	0021.0.428.000-11
Título do Projeto	Morbidade da doença de Chagas e avaliação do perfil imunológico de indivíduos sororreativos procedentes de área endêmica do oeste potiguar.

1 - RESUMO (Média de 250 palavras) Elaborado pelo(a) relator(a)

A pesquisa tem como objetivo a avaliação clínica de indivíduos sorologicamente reativos para infecção pelo *Trypanossoma cruzi* na mesorregião oeste potiguar, para correlacionar o risco de morte e a resposta imune à cardiopatia chagásica crônica - CCC. Serão avaliados indivíduos sororreativos para *T. cruzi* procedentes da zona rural de Mossoró, Caraúbas, Governador Dix-sept Rosado, Apodi, Severiano Melo e Felipe Guerra, além de pacientes com infecção chagásica pertencentes a mesorregião Oeste Potiguar que procurarem atendimento no Hospital Rafael Fernandes. O período de coleta dos dados se dará após a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP até o 2º semestre de 2012. Estão previstos ressarcimento e/ou indenização aos participantes da pesquisa, caso necessário. Os riscos decorrentes da pesquisa estão descritos bem como seus benefícios. Os sujeitos participarão da pesquisa após leitura e assinatura do TCLE e podem desistir da pesquisa a qualquer momento sem que lhe sejam imputadas nenhuma penalidade. Os dados coletados serão armazenados em computador e mídia por um período mínimo de 5 anos no laboratório de bioquímica da FACS/UERN. O material biológico será armazenado em conformidade com a resolução 347/2005 do CNS. Os gastos oriundos da pesquisa terão como fonte orçamentária recursos do CNPq e FAPERN de acordo com os editais.

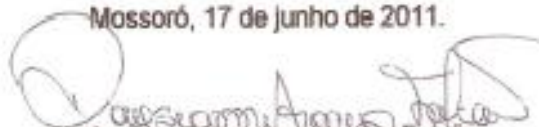
2 - ENTEDIMENTOS E RECOMENDAÇÕES

O protocolo apresentado atende às recomendações da resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96, podendo ser executado a partir da liberação deste parecer. Após o período de realização da pesquisa, o pesquisador deverá preparar um relatório final, conforme modelo contido na home page deste Comitê e em seguida encaminhá-lo a este CEP.

3- PARECER

O Protocolo de Pesquisa foi aprovado.

Mossoró, 17 de junho de 2011.


Prof. Dra. Dayseanne Araújo Falcão
Vice-Coordenadora CEP/UERN