

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Biologia Celular**

Eula Graciele Amorim Neves

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE  
CITOCINAS, QUIMIOCIAS, FATORES DE CRESCIMENTO E  
SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T ENTRE A CARDIOPATIA  
CHAGÁSICA E CARDIOPATIAS DE OUTRAS ETIOLOGIAS**

Belo Horizonte-MG  
2019

Eula Graciele Amorim Neves

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE  
CITOCINAS, QUIMIOCIAS, FATORES DE CRESCIMENTO E  
SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T ENTRE A CARDIOPATIA  
CHAGÁSICA E CARDIOPATIAS DE OUTRAS ETIOLOGIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Profa.Dra. Walderez Ornelas Dutra  
Co-orientadora: Profa.Dra. Juliana Assis Silva  
Gomes Estanislau

Belo Horizonte-MG  
2019

043 Neves, Eula Graciele Amorim.

Análise comparativa dos níveis plasmáticos de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e subpopulações de linfócitos T entre a cardiopatia chagásica e cardiopatias de outras etiologias [manuscrito] / Eula Graciele Amorim Neves. - 2019.

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

Orientador(a) Dra: Walderez Ornelas Dutra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Cardiopatias. 3. Citocinas. 4. Peptídeos e Proteínas de Sinalização Intercelular. 5. Quimiocinas. 6. Linfócitos T. 7. Resposta imune. I. Dutra, Walderez Ornelas. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



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

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
EULA GRACIELE AMORIM NEVES**

322/2019  
entrada  
2º/2017  
2017719131

Às nove horas do dia 22 de julho de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "ANÁLISE COMPARATIVA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS, FATORES DE CRESCIMENTO E SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T ENTRE A CARDIOPATIA CHAGÁSICA E CARDIOPATIAS DE OUTRAS ETIOLOGIAS", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Walderez Ornelas Dutra**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Walderez Ornelas Dutra	UFMG	Aprovada
Dra. Luciana Andrade	UFMG	Aprovada
Dra. Livia Passos	Harvard Medical School	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: A PROVA DA  
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 22 de julho de 2019.**

Drª. Walderez Ornelas Dutra (Orientadora) [Assinatura]

Drª. Luciana Andrade [Assinatura]

Drª. Livia Passos [Assinatura]

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

[Assinatura]

Prof. Erika Cristina Jorge  
Coordenadora do Programa de Pós Graduação  
em Biologia Celular ICB/UFMG

## **LOCAL DE REALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO:**

Laboratório de Biologia das Interações Celulares-ICB-UFMG

## **ORIENTAÇÃO**

Orientadora: Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra

Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana Assis Silva Gomes Estanislau

## **COLABORADORES**

### **Laboratório de Biologia das Interações Celulares**

M.Sc. Carolina Cattoni Koh

M.Sc. Ana Carolina Carvalho

Dra. Janete Soares Coelho dos Santos (afiliação atual: FUNED)

Dra. Fernanda Nobre Amaral Villani (afiliação atual: UEMG)

Dra. Lívia Silva Araújo Passos (afiliação atual: Harvard Medical School)

Dra. Luisa Mourão Dias Magalhães

### **Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais**

Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes

### **Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR**

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

### **Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical-Faculdade de Medicina.**

Vicente Rezende dos Santos

Júlia Pereira Afonso dos Santos

### **AC Camargo Cancer Center, Hospital AC Camargo, São Paulo**

Dr. Kenneth John Gollob

## **AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

**CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**FAPEMIG** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

**INCT-DT** - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais

**NIH-NIAID**- Instituto Nacional de alergia e Doenças Infecciosas (National Institute of Health - National Institute of Allergy and Infectious Disease)

## **Agradecimentos**

À profa Wal. pelo acolhimento e confiança em me receber em seu grupo de pesquisa. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados.

À Carol pela amizade, pelo companheirismo durante os experimentos, e por compartilhar seus conhecimentos e experiências comigo.

À Ana Carolina pela amizade e ajuda durante as coletas no HC.

À Dra Maria do Carmo, que é um exemplo de dedicação e amor a profissão.

À profa Juliana, que desde o início me ajudou com as suas valiosas aulas para o processo seletivo do mestrado, e pelas contribuições neste projeto como co-orientadora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular pela oportunidade.

Às agencias financiadoras e aos colaboradores pelo suporte na realização do trabalho.

À banca examinadora pelas contribuições.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Aos pacientes voluntários, sem os quais este trabalho não seria realizado.

Aos amigos que conquistei durante o mestrado e que fizeram a minha jornada “longe de casa” muito mais fácil: João, Mayara, Tereza, Bruna, Isabela, Flavinha.

Aos amigos do laboratório de Biologia das Interações Celulares pela boa convivência diária: Nay, Luiz, Otoni, Marina, Ana Alice, Cecília, Helen, Rafael, Victória, Bruna, Diana, Jaque, Janaína.

À professora Micena por todo carinho que tem comigo.

À minha família: meus pais José e Eva pelo apoio e amor incondicional; minhas irmãs, Carol e Marbia, amores da minha vida. Vocês me motivam a lutar pelos meus sonhos e vencer os desafios.

Ao meu querido Thiago por todo o apoio e incentivo.

À Deus, a minha maior gratidão, pela abundante graça e presença constante em minha vida.

O correr da vida embrulha tudo.  
A vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem  
Guimarães Rosa

## Resumo

A cardiomiopatia chagásica crônica, de etiologia inflamatória, resulta da infecção pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi*. A resposta imune tem papel determinante na progressão e patogênese da doença, por meio da liberação de mediadores inflamatórios no ambiente sistêmico e tecidual, que contribuem para o dano ao tecido cardíaco. A expressão de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em pacientes com cardiomiopatia chagásica demonstra uma associação consistente entre sua ocorrência e uma resposta imunológica predominantemente inflamatória. No entanto, ainda não está bem estabelecido se esses mecanismos são exclusivos da infecção por *T. cruzi* ou se também estão presentes em cardiopatias de outras etiologias. Diante disso, propusemos investigar se as alterações imunológicas observadas em pacientes com cardiomiopatia chagásica também poderiam ser identificadas em indivíduos com outras cardiopatias. A **hipótese** deste estudo é que há diferenças nos níveis plasmáticos de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e na frequência de subpopulações de células T em amostras de indivíduos com cardiomiopatia chagásica em comparação àqueles com cardiomiopatia idiopática, de causa desconhecida, e cardiopatia reumática, de etiologia infecciosa associada ao *Streptococcus do grupo A*. Para isso, realizamos a quantificação de mediadores solúveis (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) no plasma de indivíduos dos diferentes grupos. Adicionalmente, a frequência de subpopulações de células T foi avaliada por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstraram que os níveis plasmáticos da maioria dos mediadores solúveis analisados foram significativamente elevados na cardiomiopatia chagásica em comparação às demais cardiopatias e ao grupo controle, indicando intensa ativação imunológica nesse grupo. Por outro lado, algumas similaridades entre as cardiopatias foram evidenciadas pelo aumento de determinados mediadores comuns. Os níveis plasmáticos de IL-1Ra, por exemplo, foram elevados em todas as cardiopatias em relação ao grupo controle. Além disso, os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, da quimiocina CCL4 e do fator de crescimento PDGF-BB foram aumentados tanto na cardiomiopatia chagásica quanto na cardiopatia reumática. A análise das subpopulações de células T revelou aumento na frequência de células CD4+ e CD8+ na cardiopatia reumática, além de indicar que células CD8+ com expressão diferencial de CD28 podem participar da resposta imunológica nessa

condição. Nossos dados demonstraram, pela primeira vez, a expansão de células duplo-negativas (CD4-CD8) expressando o TCR $\gamma\delta$  nas cardiopatias reumática e idiopática, o que suscita interesse para investigações futuras sobre a contribuição funcional dessas células nesses contextos patológicos. Em conjunto, nossos achados contribuem para o avanço do conhecimento acerca da resposta imunológica em diferentes cardiopatias e indicam que a cardiopatia chagásica se associa a um estado de ativação imunológica mais intenso, possivelmente relacionado a piores desfechos clínicos em comparação às demais cardiopatias avaliadas.

Palavras-chave: cardiopatias; citocinas; fatores de crescimento; quimiocinas; linfócitos T; resposta imune.

## Abstract

Chronic Chagas cardiomyopathy, an inflammatory heart disease, results from infection by the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*. The immune response plays a pivotal role in the progression and pathogenesis of the disease through the release of inflammatory mediators in both systemic and tissue environments, contributing to cardiac tissue damage. The expression of cytokines, chemokines, and growth factors in patients with Chagas cardiomyopathy demonstrates a consistent association with a predominantly inflammatory immune profile. However, it remains unclear whether these mechanisms are exclusive to *T. cruzi* infection or if they are also present in heart diseases of other etiologies. Therefore, we aimed to investigate whether the immunological changes observed in patients with Chagas cardiomyopathy could also be identified in patients with heart diseases of other etiologies. The **hypothesis** of this study is that there are differences in the plasma levels of cytokines, chemokines, growth factors, and in the frequency of T cell subpopulations in samples from individuals with Chagas cardiomyopathy compared to those with idiopathic cardiomyopathy, of unknown cause, and rheumatic heart disease, of infectious etiology associated with *Streptococcus* group A. To address this, we quantified soluble mediators (cytokines, chemokines, and growth factors) in the plasma of individuals from different groups. In addition, the frequency of distinct T cell subpopulations was assessed by flow cytometry. Our findings demonstrated that the plasma levels of most of the soluble mediators evaluated were significantly elevated in Chagas cardiomyopathy compared to the other heart diseases and the control group, indicating a strong immune activation in this group. On the other hand, some similarities were evidenced by increased plasma levels of mediators shared across different heart diseases. Notably, IL-1Ra levels were higher in all groups when compared to controls. Moreover, the levels of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17, the chemokine CCL4, and the growth factor PDGF-BB were elevated in both Chagas and rheumatic heart diseases. The analysis of T cell subpopulations revealed an increased frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in rheumatic heart disease. It is also suggested that CD8<sup>+</sup> T cells with differential CD28 expression may be involved in the immune response in this condition. Importantly, our data demonstrated, for the first time, the expansion of double-negative (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) T cells expressing the  $\gamma\delta$  T cell receptor (TCR $\gamma\delta$ ) in rheumatic heart disease and

idiopathic cardiomyopathy, raising interest for further studies to elucidate the contribution of these cells in these diseases. Our study brings new insights into the immune response in different heart diseases. Also, the data indicates that Chagas cardiomyopathy is associated with a robust immunologic activation, possibly associated with the worse clinical outcome in relation to the other heart diseases evaluated.

Keywords: cardiopathies; cytokines; growth factors; chemokines; T lymphocytes. Immune response.

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Ciclo de Vida do <i>T. cruzi</i> .....	17
<b>Figura 2:</b> Princípio do imunoensaio Luminex.....	31
<b>Figura 3:</b> Níveis plasmáticos dos fatores de crescimento .....	35
<b>Figura 4:</b> Níveis plasmáticos de citocinas proliferativas .....	37
<b>Figura 5:</b> Níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias. ....	39
<b>Figura 6:</b> Níveis plasmáticos de citocinas derivadas de granulócitos ou células Th2.....	41
<b>Figura 7:</b> Níveis plasmáticos de citocinas regulatórias.....	43
<b>Figura 8:</b> Níveis plasmáticos de quimiocinas: CCL2 e CCL3 .....	45
<b>Figura 9:</b> Níveis plasmáticos de quimiocinas: CCL4,CCL5,CXCL8, CXCL10,CCL11 .....	46
<b>Figura 10:</b> Análise de correlação entre o níveis plasmáticos de mediadores solúveis na cardiopatia chagásica.....	47
<b>Figura 11:</b> Análise de correlação entre os níveis plasmáticos de mediadore solúveis na cardiopatia reumática.....	48
<b>Figura 12:</b> Análise por mapa de calor dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento.....	49
<b>Figura 13:</b> Análise por mapa de calor dos níveis plasmáticos de citocinas.....	50
<b>Figura 14:</b> Análise por mapa de calor dos níveis plasmáticos de quimiocinas .....	51
<b>Figura 15:</b> Análise geral por mapa de calor dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas .....	52
<b>Figura 16:</b> Análise por componentes principais (PCA) entre os mediadores solúveis e os grupos de estudo avaliados.....	54
<b>Figura 17:</b> Análise da frequência de subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	55
<b>Figura 18:</b> Análise da frequência de subpopulações de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> .....	56
<b>Figura 19:</b> Análise da frequência de subpopulações de células T duplo negativas ..	57

## **Lista de quadros**

<b>Quadro 1:</b> Citocinas e suas funções.....	26
<b>Quadro 2:</b> Quimiocinas, fatores de crescimento e suas funções.....	27

## **Lista de tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Níveis plasmáticos dos fatores de crescimento .....	34
<b>Tabela 2:</b> Níveis plasmáticos de citocinas proliferativas .....	36
<b>Tabela 3:</b> Níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias .....	38
<b>Tabela 4:</b> Níveis plasmáticos de citocinas derivadas de granulócitos e células Th2 ..	41
<b>Tabela 5:</b> Níveis plasmáticos de citocinas regulatórias .....	42
<b>Tabela 6:</b> Níveis plasmáticos de quimiocinas. ....	45

## Lista de abreviaturas

<b>A<math>\beta</math></b>	Alfa-beta
<b>APC.cy7</b>	Alofocianina cianina sete ( <i>do inglês Allophycocyanin cyanine seven</i> )
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina ( <i>do inglês, bovine serum albumin</i> )
<b>BV421</b>	Brilhante violeta 421 ( <i>do inglês Brilliant Violet 421</i> )
<b>Card-CH</b>	Cardiopatia chagásica
<b>Card-DR</b>	Cardiopatia reumática
<b>Card-Idiop</b>	Cardiopatia idiopática
<b>CD</b>	Grupos de diferenciação ( <i>do inglês Cluster of differentiation</i> )
<b>CID</b>	Cardiopatia idiopática dilatada
<b>CMSP</b>	Células mononucleares de sangue periférico
<b>CNS</b>	Conselho Nacional de Saúde
<b>COEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CONEP</b>	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
<b>DN</b>	Duplo negativas
<b>FGF-2</b>	Fator de crescimento de fibroblasto 2
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>G-CSF</b>	Fator estimulante de colônia de granulócitos
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulante de colônia de macrófagos/granulócitos
<b>HLA-DR</b>	Antígeno leucocitário humano
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1Ra</b>	Antagonista do receptor de IL-1
<b>MIF</b>	Média de Intensidade de Fluorescência
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>PBS</b>	Tampão salina-fosfato ( <i>do inglês, phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase ( <i>do inglês, Polymerase chain reaction</i> )
<b>PDGF-BB</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>Pecy7</b>	ficoeritrina cianina sete ( <i>do inglês phycoerythrin cyanine seven</i> )
<b>Percp.cy5</b>	Proteína piridina de clorofila ( <i>do inglês Peridinin Chlorophyll Protein</i> )
<b>TCLE</b>	Termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TCR</b>	Receptor de células T ( <i>do inglês, T-cell receptor</i> )
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adesão vascular 1
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>WHO</b>	Organização Mundial de Saúde ( <i>do inglês, World Health Organization</i> )
<b><math>\gamma\delta</math></b>	Gama delta

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
1.1 Doença de Chagas.....	16
1.2 Evolução clínica da doença de Chagas .....	18
1.3 Cardiopatia chagásica crônica .....	19
1.4 Cardiopatia idiopática dilatada.....	21
1.5 Cardiopatia reumática .....	22
1.6 Fatores solúveis associados `a resposta inflamatória.....	23
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>29</b>
3.1 Objetivos específicos .....	29
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
4.1 População de estudo.....	30
4.2 Ensaio para medida dos fatores solúveis .....	31
4.3. Separação de células mononucleares de sangue periférico .....	32
4.4 Imunofluorescência e citometria de fluxo .....	32
4.5 Análises estatísticas.....	33
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
5.1 Avaliação dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento.....	34
5.2 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas proliferativas .....	36
5.3 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias .....	37
5.4 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas derivadas de granulócitos e células Th2 .....	40
5.5 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas regulatórias.....	42
5.6 Avaliação dos níveis plasmáticos de quimiocinas .....	43
5.7 Análise de correlação entre quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento na cardiopatia chagásica e reumática, .....	47
5.8 Análise representativa por mapa de calor (heat map) dos níveis plasmáticos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento .....	49
5.9 Análise de componentes principais entre os níveis plasmáticos de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas entre os diferentes grupos de estudo .....	53
<b>6. Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre pacientes com cardiopatia chagásica, idiopática e reumática</b> .....	<b>55</b>
6.1 Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> entre pacientes com cardiopatia chagásica, idiopática e reumática .....	56

<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>8. CONCLUSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS.....</b>	<b>71</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>

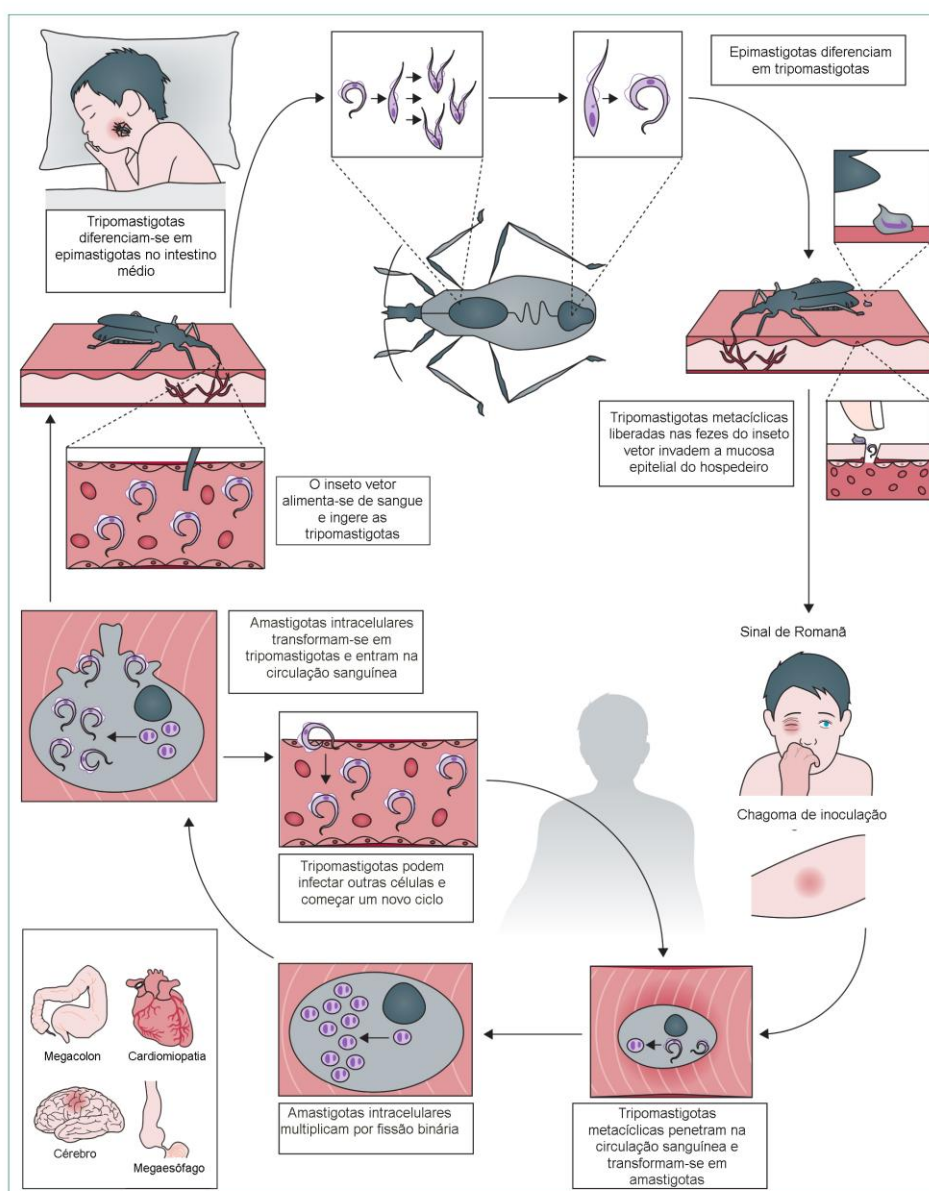
## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, causada pelo protozoário intracelular *Trypanosoma cruzi*, é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2012). Apesar dos avanços obtidos para o controle e prevenção da doença, ela ainda é um grave problema de saúde pública, com elevado índice de morbidade e mortalidade em países da América Central e do Sul (STANAWAY; ROTH, 2015). A estimativa global é de que há mais de 8 milhões de pessoas infectadas e aproximadamente 10.000 óbitos por ano (WHO, 2017). No Brasil, dados indicam uma prevalência de 4,6 milhões de indivíduos infectados (MARTINS-MELO *et al.*, 2014).

A transmissão do parasito ocorre principalmente através de insetos hematófagos, pertencentes à família Reduviidae e subfamília Triatominae. Esses vetores, ao alimentar-se de sangue de hospedeiros humanos, depositam suas fezes e/ou urina contaminadas pelas formas tripomastigotas metacíclicas na mucosa epitelial do hospedeiro. Estas formas atingem a circulação sanguínea, são internalizadas por células do hospedeiro e inicia-se o ciclo de vida de *T. cruzi* (PEREZ-MOLINA, 2018). A figura 1 mostra o ciclo de vida do parasito.

Apesar da transmissão vetorial ser a mais frequente em áreas endêmicas, a transmissão por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e por via congênita é preocupante nos países não endêmicos (STEVERDING, 2014). Adicionalmente, no Brasil, estudos registraram surtos de infecção aguda por ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi* (DE NOYA *et al.*, 2016; ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). Por muito tempo, a doença de Chagas foi considerada endêmica apenas em regiões rurais onde os vetores se alojavam em reservatórios domésticos. No entanto, o êxodo rural para centros urbanos, aspectos socioeconômicos, mudanças climáticas e imigrações, contribuíram para a disseminação da doença em áreas não endêmicas, como em países da Europa, Canadá, Austrália e Estados Unidos. Com isso, houve uma alteração do perfil epidemiológico para um contexto urbano (PINTO DIAS, 2013).



**Figura 1:** Ciclo de Vida do *T. cruzi* (adaptado de Perez-Molina, 2018).

No hospedeiro humano, após o repasto sanguíneo, o inseto vetor libera urina ou fezes contaminadas com as tripomastigotas metacíclicas, que invadem a mucosa epitelial do hospedeiro. Essas formas infectivas entram na circulação sanguínea, penetram nas células e transformam-se em amastigotas intracelulares e multiplicam-se por fissão binária. No citoplasma das células, transformam-se em tripomastigotas, e são liberadas na corrente sanguínea disseminando a infecção. O inseto vetor ao alimentar-se de sangue de um hospedeiro humano, ingere as tripomastigotas, que posteriormente, diferenciam-se em epimastigotas no intestino médio do triatomíneo, dando continuidade ao ciclo de vida do *T. cruzi*.

## 1.2 Evolução clínica da doença de Chagas

Clinicamente, a doença de Chagas pode ser classificada em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda pode ser assintomática, e o parasito pode ser detectado facilmente em exames de sangue a fresco. Os indivíduos acometidos apresentam sintomas inespecíficos como: febre, mal-estar, problemas respiratórios, dor muscular, em um período de 4 a 8 semanas. Alguns indivíduos apresentam sintomas específicos, como a presença de um sinal clínico chamado sinal de Romanã, quando a picada pelo inseto vetor ocorre próxima ao olho (DIAS, 1997).

Na doença humana, os dados sobre a resposta imune na fase aguda são escassos. A expansão de células B convencionais e de células NK já foi relatada em crianças na fase inicial da infecção por *T. cruzi* (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2003). Estudos em modelos experimentais mostraram que os eventos imunológicos ocorridos na fase aguda são caracterizados pela ação de células inflamatórias da imunidade inata, principalmente neutrófilos, células NK e macrófagos, que controlam a carga parasitária (GAZZINELLI, 1998; SILVA *et al.*, 1998; UNE *et al.*, 2000). A ativação policlonal de linfócitos e a resposta celular e humoral contribui para controlar a parasitemia (D'IMPERIO LIMA *et al.*, 1886; KRETTLI; BRENER, 1982; MINOPRIO *et al.*, 1886).

Mimetizando o primeiro contato com o parasito, numa situação de infecção aguda, Magalhães e colaboradores (2015) demonstraram que monócitos de indivíduos saudáveis, infectados *in vitro* por diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam perfil distinto de produção de citocinas, o que pode influenciar diretamente na resposta imune protetora ou patogênica do hospedeiro (MAGALHÃES *et al.*, 2015). Se não for tratada, a infecção pode progredir para fase crônica.

Na fase crônica, a grande maioria dos indivíduos desenvolve uma forma em que a doença apenas pode ser evidenciada por exames laboratoriais, uma vez que não há sintomas ou sinais clínicos da infecção (NUNES *et al.*, 2018). Essa forma, que atinge aproximadamente 60% dos pacientes crônicos com doença de Chagas, é denominada indeterminada (CASTILLO-RIQUELME, 2017; MACÊDO, 1999). Aproximadamente 30% dos indivíduos cronicamente infectados com *T. cruzi*, evoluem para doença cardíaca ou alterações digestivas (STANAWAY; ROTH, 2015). Na forma cardíaca, pode ocorrer morte súbita, devido a quadros clínicos de arritmias ou

insuficiência cardíaca causada por dano muscular cardíaco (RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O tratamento para doença de Chagas recomendado pelo Ministério da Saúde emprega medicamentos antiparasitários, eficazes principalmente na fase aguda da infecção, e que causam efeitos indesejáveis, são eles o nifurtimox e benzonidazol (PÉREZ-ANTÓN *et al.*, 2018; SOSA-ESTANI; VIOTTI; SEGURA, 2009; VIOTTI *et al.*, 2014). Estudos indicam que fatores genéticos e resposta imune do hospedeiro, bem como a diversidade genética de diferentes cepas do parasito podem determinar a forma clínica do paciente (BUSCAGLIA; DI NOIA, 2003). No entanto, ainda não estão bem estabelecidos os fatores que definem a resposta imune protetora ou patogênica na infecção por *T. cruzi*.

### 1.3 Cardiopatia chagásica crônica

A cardiopatia chagásica crônica é considerada um grave problema de saúde pública em áreas endêmicas da América Latina, sendo uma das principais causas de insuficiência cardíaca e morte súbita (BOCCHI *et al.*, 2013). Trata-se de uma cardiopatia predominantemente inflamatória que induz a necrose de cardiomiócitos e lesão fibrótica (MAYA *et al.*, 2017). Os indivíduos clinicamente acometidos progridem com dilatação e disfunção ventricular direita e/ou esquerda, eventos tromboembólicos e alterações na geração e condução de impulsos elétricos cardíacos (NUNES *et al.*, 2004). A diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo é um importante preditor de mau prognóstico e mortalidade (Andrade *et al.*, 2011).

Apesar do parasito, não ser detectado facilmente na infecção crônica, estudos utilizando técnicas de imuno-histoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR) detectaram antígenos de *T. cruzi* em autopsias de pacientes crônicos (BELLOTTI *et al.*, 1996; BENVENUTI *et al.*, 2008). A inflamação mediada pelo parasitismo nas fibras cardíacas, e resposta imune persistente pela apresentação contínua de antígenos de *T. cruzi*, são os principais fatores que podem contribuir para a patogênese da doença (SIMÕES *et al.*, 2018).

O infiltrado inflamatório presente no miocárdio de pacientes cronicamente infectados é constituído por macrófagos, células B, e principalmente células T, em sua maioria células CD8<sup>+</sup> citotóxicas seguidas por células CD4<sup>+</sup> (HIGUCHI *et al.*, 1993).

Os linfócitos T ativados são essenciais para a produção de citocinas inflamatórias como o TNF e IFN- $\gamma$ , que podem ativar células para controlar o parasitismo. Entretanto, a secreção dessas citocinas na fase crônica, correlaciona-se positivamente com o desenvolvimento de cardiopatia severa devido ao efeito pró-inflamatório exacerbado (GOMES *et al.*, 2003; MENEZES *et al.*, 2004).

A presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativados, responsivos a antígenos do parasito e do hospedeiro, já foi demonstrada na doença de Chagas (DUTRA *et al.*, 1994; DUTRA *et al.*, 2000). Além disso, uma população celular que não expressa a molécula co-estimulatória CD28 aparece elevada em pacientes com a doença de Chagas crônica (DUTRA *et al.*, 1996). As células T CD28<sup>-</sup> são importantes produtoras de citocinas imunorregulatórias e estão associadas com perfil inflamatório e anti-inflamatório em pacientes das formas cardíaca e indeterminada, respectivamente (MENEZES *et al.*, 2004; MENEZES *et al.*, 2011). Adicionalmente, nosso grupo demonstrou que linfócitos T que não expressam os correceptores CD4 e CD8 (chamados CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> duplo-negativos-DN), estão aumentados no sangue periférico de pacientes chagásicos (VILLANI *et al.*, 2010). Estas células expressam os receptores de células T (TCR) alfa-beta ( $\alpha\beta$ ) ou gama-delta ( $\gamma\delta$ ), sendo ambas as populações, importantes fontes de citocinas imunorregulatórias (AMARAL VILLANI *et al.*, 2010). De forma importante, a inibição da ativação destas células pode mudar o perfil inflamatório observado em pacientes com cardiopatia para um perfil anti-inflamatório (PASSOS *et al.*, 2016).

Os mecanismos de recrutamento de células inflamatórias para o tecido cardíaco não estão bem esclarecidos, no entanto, sabe-se que as quimiocinas estão diretamente associadas com o recrutamento leucocitário. A expressão de quimiocinas que recrutam preferencialmente células associadas à resposta Th1, tem sido claramente associada com a gravidade na cardiopatia chagásica (CUNHA-NETO *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2003; TALVANI *et al.*, 2004).

Alguns estudos já descreveram biomarcadores que podem indicar lesão no miocárdio e insuficiência cardíaca. O aumento do peptídeo natriurético tipo B, a troponina I, metaloproteinase 2 e o inibidor tecidual de metaloproteinases 1 e 2 correlacionou-se com o nível de gravidade da doença (OKAMOTO *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2006). A insuficiência cardíaca na doença de Chagas, pode estar associada com maior morbidade em relação a outras cardiopatias de etiologias não

chagásica, como na cardiopatia idiopática dilatada e a cardiopatia reumática, esta última derivada da infecção bacteriana com *Streptococcus* do grupo A (BARBOSA *et al.*, 2011; BESTETTI; MUCCILLO, 1997; NUNES *et al.*, 2010).

#### **1.4 Cardiopatia idiopática dilatada**

A cardiopatia idiopática dilatada (CID) consiste em uma disfunção do miocárdio em que ocorre dilatação e alterações contrateis no ventrículo direito e/ou esquerdo com evolução para insuficiência cardíaca congestiva (MARON *et al.*, 2006). Algumas características histopatológicas da CID são semelhantes às que ocorrem na doença de Chagas, como formação de fibrose e necrose de cardiomiócitos. No entanto, CID distingue-se da cardiopatia chagásica pela mínima ou ausência de células mononucleares infiltrantes o que indica um menor potencial inflamatório (DE LEEUW *et al.*, 2001).

Os indivíduos acometidos com CID, frequentemente são jovens, com idade variável entre 20 e 60 anos. Os métodos para distinguir a doença de outras cardiopatias consistem em testes de diagnóstico específicos, como marcadores sorológicos e biópsias cardíacas (HAZEBROEK; DENNERT; HEYMANS, 2012). Apesar de não apresentar uma causa específica conhecida, alguns fatores já foram relatados como possíveis estímulos desencadeadores: doença mediada por vírus, resposta imune desregulada, distúrbios tóxicos e metabólicos induzidos pelo álcool e drogas quimioterápicas (HAZEBROEK; DENNERT; HEYMANS, 2012).

Secundariamente, após uma infecção viral, mecanismos autoimunes podem ser importantes gatilhos para a miocardite e progressão para cardiopatia idiopática, caracterizados principalmente pelo mimetismo molecular entre antígenos presentes no miocárdio e antígenos virais (DENNERT; CRIJNS; HEYMANS, 2008). Além disso, a apresentação antigênica viral persistente, após a infecção primária, pode mediar a ativação de células T e induzir mecanismos inflamatórios (HUBER *et al.*, 1989; MOBINI; ANDERSSON, 2005).

A hipótese de reposta autoimune como fator determinante para a CID é sustentada pelo aumento na razão CD4/CD8 e redução na frequência de células CD8 citotóxicas em indivíduos com CID (HUBER *et al.*, 1989; MARUTA *et al.*, 1991). A

expressão de marcadores de ativação em subpopulações de células T como o HLA-DR já foi relatada (UENO *et al.*, 2007) .

Adicionalmente, fatores genéticos também já foram associados com a etiologia dessa cardiopatia, o que sugere a inclusão de testes genéticos na prática clínica para rastreamento da doença. A transmissão autossômica dominante foi descrita como a mais comum, e aproximadamente 40 genes já foram identificados como associados a CID. Dentre os fatores genéticos associados, mutações em genes codificadores de proteínas do citoesqueleto e contráteis já foram relatadas (TOWBIN *et al.*, 2014).

### 1.5 Cardiopatia reumática

A cardiopatia reumática é um acometimento grave decorrente da febre reumática aguda não tratada, causada pela infecção com o *Streptococcus pyogenes*, uma bactéria  $\beta$ -hemolítica do grupo A (WALKER *et al.*, 2014). É uma das principais causas de doença cardiovascular em países menos desenvolvidos, apresentando um alto índice de morbidade em adolescentes e jovens adultos geneticamente susceptíveis (World Heart Federation, 2019).

Trata-se de uma reação autoimune que ocorre devido ao mimetismo antigênico entre proteínas da bactéria e proteínas valvares, que induz danos persistentes nas válvulas cardíacas, com progressão para regurgitação ou estenose mitral e/ou aórtica (CARAPETIS *et al.*, 2016). A proteína M presente no *S. pyogenes* é a principal estrutura antigênica, pois possui homologia com a miosina cardíaca, a tropomiosina, laminina, vimentina, entre outras proteínas valvares (FAE *et al.*, 2014).

A reação autoimune na cardiopatia reumática é mediada pela imunidade humoral e celular. Estudos anteriores já demonstraram a predominância de células T CD4<sup>+</sup> em sangue periférico de pacientes com cardiopatia reumática (MORRIS . *et al.*, 1993). Além disso, ocorre aumento na frequência de células T CD8<sup>+</sup> durante a infecção crônica (TOOR; VOHRA, 2012). Carrion *et al.* (2003) relataram uma depleção da região V $\beta$ 2 do TCR em células CD8<sup>+</sup> circulantes de pacientes com a cardiopatia reumática, crônica, sugerindo mais uma vez, o papel de superantígenos ou autoantígenos cardíacos na patogênese dessa doença (CARRION *et al.*, 2003).

Na imunidade humoral, os autoanticorpos se ligam no endotélio das valvas e pela expressão da molécula de adesão VCAM-1 induz a infiltração de células T no

tecido valvar (ROBERTS *et al.*, 2001). Essas células reconhecem peptídeos de miosina homólogos a epítomos imunodominantes da proteína M5, conduzindo para uma resposta inflamatória exacerbada que culmina nas lesões valvares (EL-DEMELLAWY *et al.*, 1997). O infiltrado inflamatório consiste ainda, em citocinas pró-inflamatórias (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-17), macrófagos que modulam a produção de citocinas e metaloproteinases da matriz extracelular, importantes mediadores da formação de fibrose (EL-DEMELLAWY *et al.*, 1997). Interessantemente, a citocina IL-10 participa da cronicidade da doença em pacientes que realizaram trocar valvar (LEÃO *et al.*, 2014).

A progressão da cardiopatia reumática pode estar associada com a escassez de IL-4 no tecido valvar e com deficiência de células T regulatórias circulantes, o que pode contribuir para manutenção da resposta efetora (GUILHERME *et al.*, 2004; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2016). Adicionalmente, o papel de quimiocinas (CCL3, CXCL9) já foi relatado, por acentuar a migração de células T para os locais de lesão que podem ocorrer próximo ou diretamente na válvula, no endocárdio ou miocárdio (FAÉ *et al.*, 2013; ROBERTS *et al.*, 2001).

## **1.6 Fatores solúveis associados à resposta inflamatória**

A inflamação consiste em uma reação imunológica a diferentes estímulos, a fim de manter a homeostase tecidual ou sistêmica. Estes estímulos podem ser de natureza infecciosa por vírus, bactérias e protozoários, ou não infecciosa caracterizada por distúrbios físicos, químicos, ou biológicos (MEDZHITOV, 2010; ZHANG, 2009). A inflamação aguda consiste na ativação de mecanismos que envolvem a interação entre células e moléculas para restauração do quadro clínico proeminente (LAWRENCE, 2009). No entanto, muitas vezes, uma resposta imune de fase aguda não controlada pode contribuir para a inflamação crônica em muitas doenças, como ocorre, no câncer, doenças autoimunes (cardiopatia reumática), e doenças cardiovasculares (doença de Chagas, infarto do miocárdio) (DUTRA. *et al.*, 1994; FANOLA *et al.*, 2017; KUWABARA *et al.*, 2017; MENEZES *et al.*, 2011; TANIGUCHI; KARIN, 2014).

Os principais mediadores da resposta inflamatória são fatores solúveis que incluem citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Essas moléculas podem ser

sintetizadas por diversas células, incluindo monócitos /macrófagos, células T, células endoteliais, fibroblastos, entre outras (ZHANG , 2009). As citocinas são pequenas proteínas que modulam a resposta imune, inibindo a inflamação pela ação de citocinas consideradas regulatórias (IL-1Ra, L-10), ou acentuando o processo inflamatório, que pode envolver a participação de citocinas distintas, dependendo da patologia (IL1- $\beta$ , TNF, IL-6, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13 e IL-9), que muitas vezes, induz dano tecidual em muitas doenças crônicas (SHACHAR; KARIN, 2013; TURNER *et al.*, 2014). As fontes celulares das citocinas são variáveis, dependendo da condição fisiológica ou patológica. As citocinas tem importante papel em ativar/controlar diferentes tipos celulares, regular a expressão de moléculas de adesão ou quimiocinas e, portanto, são importantes orquestradoras de toda a resposta imunológica (ZHANG , 2009).

As quimiocinas são proteínas com atividade quimiotática, que atuam prioritariamente na ativação e recrutamento de células efetoras, como monócitos/macrófagos, granulócitos e células T, para sítios de lesão inflamatória (RIDIANDRIES; TAN; BURSILL, 2018). As quimiocinas podem ser subdivididas em 4 famílias com base na posição de resíduos de cisteína na região N-terminal (DUSI *et al.*, 2016). O grupo C-X-C possui dois resíduos de cisteínas separados por um aminoácido, enquanto a subfamília C-C é caracterizada pelas cisteínas adjacentes entre si. A subfamília C possui um único resíduo de cisteína localizado na posição conservada e o quarto grupo de quimiocinas CX<sub>3</sub>C, caracteriza-se por dois resíduos de cisteína que são separados por três aminoácidos variáveis. A subfamília CC é o maior dos grupos com 28 membros, seguido pela classe CXC com 17 moléculas (TURNER *et al.*, 2014; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000). Adicionalmente, as quimiocinas podem ser funcionalmente classificadas como inflamatórias, responsáveis pelo recrutamento celular de células efetoras para sítios de infecção, inflamação e dano tecidual, ou ainda classificadas como quimiocinas homeostáticas que controlam o movimento quimiotático de células de memória pelos tecidos periféricos saudáveis. De forma interessante, algumas dessas moléculas podem exercer dupla função, mediando funções de natureza inflamatória ou regulando células não efetoras (MOSER *et al.*, 2004).

Adicionalmente, ao papel de citocinas e quimiocinas, os fatores de crescimento são liberados durante processos inflamatórios, sendo associados com a proliferação

e recrutamento de células endoteliais e fibroblastos que induzem o reparo tecidual ou lesão fibrótica em muitas doenças crônicas (WAHL; WONG; MCCARTNEY-FRANCIS, 1989). As citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento analisados neste trabalho, assim como suas fontes produtoras, dentre as principais células do sistema imune, e suas funções principais estão descritos nos quadros 1 e 2.

É interessante relatar que muitas dessas moléculas já foram descritas como mediadores da inflamação crônica na cardiopatia chagásica. No entanto, ainda não é bem esclarecido, se esses mecanismos são encontrados apenas na cardiopatia decorrente da infecção pelo *T. cruzi*, ou se são comuns em cardiopatias de outras etiologias. Nesse sentido, nossa **hipótese** de trabalho é que há diferença nos níveis plasmáticos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, e na frequência de subpopulações de células T em amostras de indivíduos chagásicos cardiopatas em relação a cardiopatia reumática e idiopática.

A realização deste trabalho nos traz importantes informações a respeito de características imunológicas que são próprias da cardiopatia chagásica, ajudando na sua identificação e no entendimento dos mecanismos patogênicos associados a ela. Isso permite a identificação de possíveis biomarcadores e alvos terapêuticos. Por outro lado, a identificação de características comuns à cardiopatia chagásica e às outras cardiopatias, também pode trazer importante contribuição para o entendimento da patogênese de cardiopatias em geral, apontando para alvos de mais ampla aplicabilidade.

**Quadro 1:** Resumo das principais citocinas estudadas neste trabalho, suas fontes celulares e suas funções.

<b>Citocinas</b>	<b>Principal fonte</b>	<b>Função</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Macrófagos, monócitos	Pró inflamatória, proliferação, apoptose e diferenciação
<b>IL-1Ra</b>	Neutrófilos, macrófagos, monócitos	Antagonista da resposta pró-inflamatória
<b>IL-2</b>	Células T	Proliferação e ativação
<b>IL-4</b>	Células T <i>helper</i> , mastócitos, basófilos, eosinófilos ativados	Anti-inflamatória, proliferação de células B e T
<b>IL-5</b>	Células T <i>helper</i>	Ativação e diferenciação de eosinófilos, diferenciação de células B
<b>IL-6</b>	Macrófagos, células T, adipócitos	Pró inflamatória, diferenciação, produção de citocinas
<b>IL-7</b>	Células estromais, células epiteliais	Fator de crescimento de células B e T
<b>IL-9</b>	Linfócitos T CD4+ e mastócitos ativados.	Proliferação de mastócitos
<b>IL-10</b>	Monócitos, células B, células T	Anti-inflamatória
<b>IL12p70</b>	Macrófagos, células dendríticas, neutrófilos	Pró inflamatória, diferenciação, ativação de células NK.
<b>IL-13</b>	Linfócitos T CD4+	Inflamação alérgica e fibrose.
<b>IL-15</b>	Células dendríticas e macrófagos	Sobrevivência de células T e NK, Diferenciação de células T e NK
<b>IL-17</b>	Células Th17, células T $\gamma\delta$ . Células iNKT	Pró inflamatória, recrutamento de neutrófilos,
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Células T, células NK, células NKT	Pró inflamatória, imunidade inata, imunidade antiviral
<b>TNF</b>	Macrófagos, células NK, linfócitos, linfócitos CD4+, adipócitos	Pró inflamatória, produção de citocinas, proliferação celular

**Quadro 2:** Resumo de quimiocinas e fatores de crescimento estudados neste trabalho, suas fontes celulares e suas funções.

<b>Quimiocinas e fatores de crescimento</b>	<b>Principal fonte</b>	<b>Função</b>
<b>CCL2</b>	Monócitos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais	Recrutamento de monócitos, infiltração de linfócitos T de memória e células NK
<b>CCL3</b>	Macrófagos	Recrutamento celular, ativação de neutrófilos, indução da síntese de citocinas
<b>CCL4</b>	Macrófagos	Recrutamento de células T, monócitos e células NK, ativação de neutrófilos
<b>CCL5</b>	Monócitos, macrófagos e células T	Recrutamento de leucócitos
<b>CXCL8</b>	Macrófagos, células endoteliais, células epiteliais	Pró inflamatória, quimiotaxia, angiogênese
<b>CXCL10</b>	Células T, células B, células epiteliais e endoteliais	Pró inflamatória, recrutamento e potencialização da resposta Th1
<b>CCL11</b>	Eosinófilos	Recrutamento celular de eosinófilos
<b>G-CSF</b>	Células estromais, endotélio, macrófagos	Proliferação e diferenciação de neutrófilos, apoptose, secreção de citocinas
<b>GM-CSF</b>	Células T, macrófagos, fibroblastos	Pró inflamatória, ativação de macrófagos, produção de neutrófilos, monócitos e eosinófilos
<b>FGF-Basic</b>	Miócitos cardíacos, fibroblastos cardíacos, células endoteliais, células musculares lisas	Angiogênese, diferenciação e migração celular, proliferação celular
<b>VEGF</b>	Células T, células musculares lisas, células epiteliais	Angiogênese, quimiotaxia, co-estimulação de IFN- $\gamma$
<b>PFGF-BB</b>	Plaquetas, macrófagos, fibroblastos	Cicatrização tecidual, recrutamento celular, fibrose

## 2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é considerada um grave problema de saúde pública, com mais 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo e 100 milhões de pessoas em risco. Aproximadamente 30% dos indivíduos que evoluem para a fase crônica da doença, desenvolvem cardiopatia dilatada com insuficiência congestiva grave, responsável por altos índices de internações hospitalares e aproximadamente 10.000 óbitos por ano em consequência da doença.

Em estudos anteriores já foi evidenciado que a cardiopatia chagásica, de etiologia predominantemente inflamatória, apresenta um pior prognóstico em relação às outras cardiopatias, como as cardiopatias idiopáticas dilatadas. A maioria dos estudos relatados foram baseados na avaliação de parâmetros clínicos como preditores de gravidade.

Como a cardiopatia chagásica é claramente associada à resposta imune do indivíduo, uma pergunta importante é avaliar se essa resposta é diferente em cardiopatias de etiologia distinta. No entanto, a maioria dos estudos sobre a resposta imune foram baseados na diferença entre indivíduos com cardiopatia chagásica e indivíduos assintomáticos da forma clínica indeterminada, evidenciando que a resposta imune é, de fato, um importante fator associado com a progressão clínica diferencial da doença, mas sem esclarecer se essa resposta difere entre cardiopatias distintas.

Nesse sentido, elaboramos o presente estudo, através do qual pretendemos responder se há diferença no perfil imunológico de indivíduos com cardiopatia chagásica em relação a outras cardiopatias, avaliando a produção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, assim como a frequência de subpopulações celulares no sangue periférico dos pacientes com cardiopatia chagásica, reumática e idiopática. Este estudo permitirá identificar características específicas da doença de Chagas, e outras comuns às diferentes cardiopatias, apontando para estratégias de intervenção específicas (ou gerais), assim como potenciais biomarcadores.

### 3. OBJETIVO GERAL

Comparar os níveis plasmáticos de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e subpopulações de linfócitos T entre a cardiopatia chagásica e cardiopatias de outras etiologias

#### 3.1 Objetivos específicos

Em pacientes chagásicos cardiopatas e portadores de cardiopatias idiopática ou reumática, avaliar:

1. Os níveis plasmáticos de fatores de crescimento (G-CSF, GM-CSF, PDGF-BB, VEGF, FGF-2).
2. Os níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF), proliferativas (IL-2, IL-7, IL-15), regulatórias (IL-1Ra e IL-10), derivadas de células Th2 e granulócitos (IL-4,IL-5,IL-9,IL-13).
3. Os níveis plasmáticos de quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10, CCL11).
4. A frequência das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> com expressão diferencial de CD28;
5. A frequência de linfócitos T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> expressando os TCR alfa-beta ou gama-delta.

## 4. METODOLOGIA:

### 4.1 População de estudo

Este estudo foi realizado com amostras de sangue de indivíduos voluntários incluídos nos seguintes grupos:

**Grupo de indivíduos com cardiopatia chagásica (Card-CH):** indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* da forma clínica cardíaca, selecionados no centro de treinamento e referência em doenças infecciosas e parasitárias Orestes-Diniz -CTR-DIP), e pacientes em acompanhamento clínico no ambulatório de cardiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Grupo de indivíduos com cardiopatia reumática (Card-DR):** indivíduos com diagnóstico de doença reumática atendidos no hospital das Clínicas de Belo Horizonte.

**Grupo de indivíduos com cardiopatia idiopática (Card-Idiop):** indivíduos portadores de distúrbios cardíacos por causa desconhecida, com sorologia negativa para doença de Chagas.

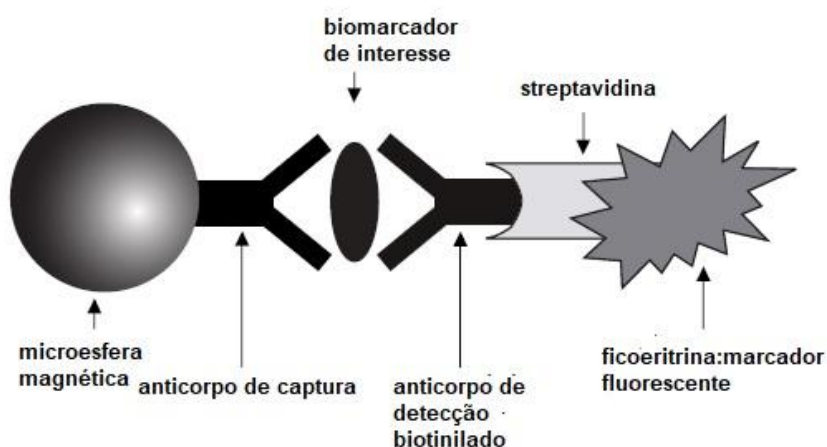
**Grupo de indivíduos não cardiopatas (Controle):** indivíduos saudáveis não cardiopatas pertencentes ao grupo controle.

Para os experimentos de dosagem de fatores solúveis no plasma foram avaliadas amostras de plasma de 38 Card-CH, 17 Card-DR e 5 Card-Idiop. Para os ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo, o estudo foi realizado com amostras de sangue periférico de 14 indivíduos voluntários com sorologia positiva para *T. cruzi*, (Card-CH), 9 indivíduos idiopáticos (Card-Idiop) e 12 indivíduos com cardiopatia reumática (Card-DR) em acompanhamento clínico no ambulatório de cardiologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a responsabilidade da Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes. Todos os participantes foram informados sobre os objetivos de estudo do projeto, com apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O trabalho foi conduzido de acordo com as exigências da resolução CNS 196/96 seguindo os aspectos éticos envolvendo pesquisa com seres humanos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFGM-ÉTIC006/05) e Comissão Nacional de Ética em pesquisa (CONEP nº do parecer 2.809.859).

## 4.2 Ensaio para medida dos fatores solúveis

Amostras de plasma dos diferentes grupos foram coletadas anteriormente por nós e colaboradores do nosso grupo, armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Biologia das Interações Celulares. As amostras plasmáticas foram analisadas pelo Kit Bio-Plex Pro<sup>TM</sup> Human Cytokine Standard 27-plex (Biorad-Hercules–California, Estados Unidos da América), ensaio que permitiu a avaliação das seguintes moléculas: citocinas (IL-1 $\beta$ , IL1-Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF), fatores de crescimento (G-CSF, GM-CSF, PDGF-BB, VEGF, FGF-2) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10, CCL11). Os dados foram adquiridos pelo instrumento Bio-Plex 200 equipado com o software Manager. Os resultados foram expressos pela média de intensidade de fluorescência.

O princípio do ensaio luminex, mostrado na figura 2, baseia-se em anticorpos de captura, ligados de forma covalente com microesferas magnéticas, que irão reagir com a molécula de interesse presente na amostra. Posteriormente, é realizada uma série de lavagens para remoção de proteínas não ligadas, e então um anticorpo de detecção biotilado é adicionado formando um complexo sanduiche. A detecção final é baseada na adição de um corante repórter, a streptavidina conjugada com a ficoeritrina (SA-PE).



**Figura 2:** princípio do imunoensaio Luminex: baseia-se em microesferas magnéticas ligadas a anticorpos de captura de forma covalente. A amostra de interesse liga-se a este complexo e ao anticorpo de detecção biotilado. A detecção final é baseada na adição de um corante repórter, a streptavidina conjugada com a ficoeritrina (SA-PE).

### 4.3. Separação de células mononucleares de sangue periférico

As células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de cada participante incluído no estudo foram obtidas pela separação de sangue total diluído com volume igual de tampão fosfato salino (PBS) 1x, sobre *ficoll-paque* (Pharmacia). Após a centrifugação (40 minutos a 300xg e 20 °C), foi realizada a coleta do anel leucocitário e, posteriormente, 3 etapas de lavagens com PBS 1x. Ao final, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer, na diluição 1:20, em solução de Turks (Sigma-Aldrich, EUA) e ajustadas para a concentração de  $1,0 \times 10^7$  células/mL.

### 4.4 Imunofluorescência e citometria de fluxo

As suspensões celulares dos diferentes grupos foram utilizadas para análise por imunofluorescência. Foram utilizadas combinações de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos específicos para marcadores de superfície de células humanas, incluindo anti-CD4 Percp.cy5 (clone A161A1), anti-CD8 APC.cy7 (clone SK1), anti-CD28 pecy7 (clone CD28.2), anti-TCR $\alpha\beta$  FITC (clone IP26) e anti-TCR $\gamma\delta$  BV421 (clone B1), para identificar as subpopulações específicas de células T. Todos os anticorpos utilizados foram da Biolegend.

$2,5 \times 10^5$  células foram adicionadas a tubos de poliestireno de 5mL, com posterior adição de 40 $\mu$ L de solução constituída por uma combinação de anticorpos conjugados com diferentes fluorocromos diluídos em tampão contendo 0,01% de azida sódica e 0,2% de albumina sérica bovina (BSA). As concentrações foram determinadas por testes de titulação previamente realizados por nós. Após o término da incubação por 30 minutos a 4°C, as células foram lavadas com PBS 1x gelado por centrifugação (300xg, por 10 minutos, a 4°C) e fixadas com formaldeído 2%, por incubação por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes com PBS1x (300xg, 10 minutos a 4 °C), ressuspensas em 200ul de PBS e adquiridas no citômetro de fluxo (FACScanto II). Para cada amostra, foram adquiridos, em média, 100.000 eventos. Todos os dados obtidos foram analisados através do programa para análise de citometria de fluxo FlowJo versão 10.

#### 4.5 Análises estatísticas

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados utilizando o software Graphpad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla – CA, EUA). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro- Wilk para verificação da distribuição dos dados. Os dados com distribuição normal, considerados paramétricos foram submetidos ao teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, e os dados representados pela média e desvio padrão. Os dados com distribuição não normal, considerados não paramétricos, foram analisados pelo teste de Kuskal-Wallis, seguido pelos pós teste de Dunn e representados pela mediana e intervalo interquartil (intervalo 25 e 75 percentis). Análises de correlação foram realizadas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson para variáveis paramétricas, e o teste de Spearman para variáveis não paramétricas. Valor de  $p < 0,05$  foram considerados estaticamente significativos para todos os dados avaliados.

Análises de componentes principais e mapas de calor foram realizadas utilizando o software Clustvis.

## 5. RESULTADOS

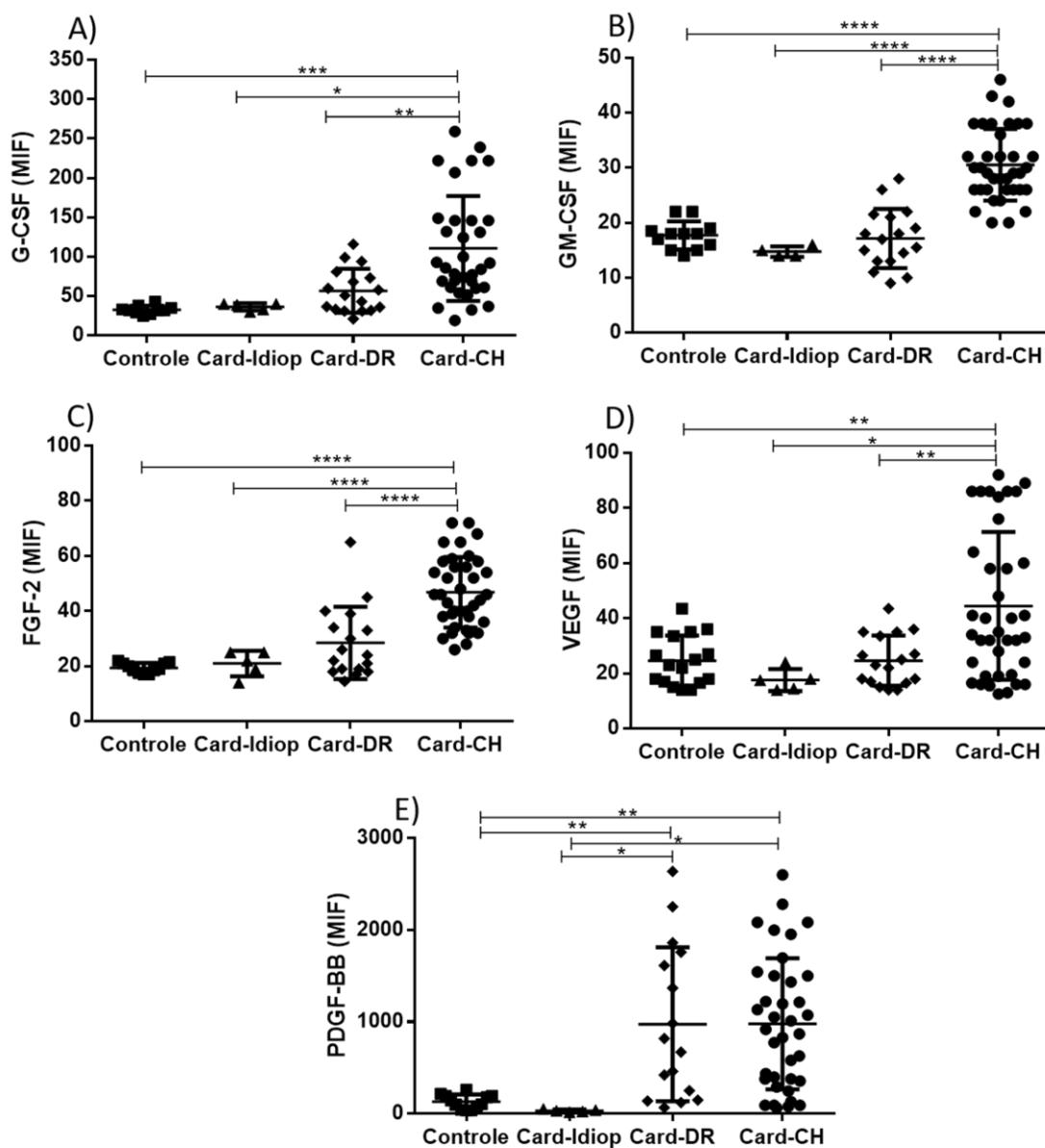
### 5.1 Avaliação dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são moléculas capazes de regular diversas funções celulares, induzindo angiogênese, reparo tecidual, proliferação e migração celular (WAHL; WONG; MCCARTNEY-FRANCIS, 1989). Nesse sentido, neste trabalho, foi realizado um estudo comparativo da liberação plasmática dessas moléculas entre as diferentes cardiopatias e o grupo controle. Os dados da tabela expressam a média e desvio padrão de cada molécula para cada grupo de estudo. Os dados referentes a tabela 1 estão demonstrados na figura 3 através do gráfico de dispersão.

Na figura 3, é possível observar que o grupo com cardiopatia chagásica (Card-CH) apresentou níveis elevados dos fatores G-CSF (figura 3A), GM-CSF (figura 3B), FGF-2 (figura 3C), VEGF (figura 3D), e PDGF-BB (figura 3E) quando comparado aos demais grupos (Card-DR, Card-Idiop e Controle). Não houve diferença na liberação plasmática entre o grupo Card-DR e Card-Idiop, e entre esses e o grupo Controle. Além disso, os dados do fator de crescimento PDGF-BB (figura 3E) indicaram níveis maiores no grupo Card-DR em relação ao grupo Card-Idiop e Controle. Adicionalmente, é importante destacar que em todos os fatores estudados, os níveis plasmáticos no grupo com a cardiopatia idiopática foram semelhantes aos níveis encontrados nos plasmas do grupo Controle.

**Tabela 1:** Níveis plasmáticos dos fatores de crescimento. Os dados paramétricos foram expressos pela média e desvio padrão.

Fatores de crescimento	Controle	Card-Idiop	Card-DR	Card-CH
<b>G-CSF</b>	32,60±5,23	36,40±4,61	56,68±27,97	110,6 ±66,58
<b>GM-CSF</b>	17,71± 2,54	14,75±0,95	17,15±5,37	30,54±6,50
<b>FGF-2</b>	19,36 ±1,83	21,00±4,6	28,50 ±13,12	46,86 ±12,78
<b>VEGF</b>	24,65±9,11	17,60±3,99	24,65 ± 9,11	44,47±26,78
<b>PDGF-BB</b>	131,6±77,05	31,80±13,94	973,2±837,2	978,6±714,7



**Figura 3:** Níveis plasmáticos dos fatores de crescimento: GCS-F(A), GM-CSF (B), FGF-2 (C), VEGF (D), PDGF-BB (E) em amostras de indivíduos do grupo Controle (n=13), com cardiopatias idiopática (Card-Idiop, n=5), reumática (Card-DR, n=17) e chagásica (Card-CH, n=38). Valores individuais foram expressos pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estaticamente significativos. \* significa  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  \*\*\* e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

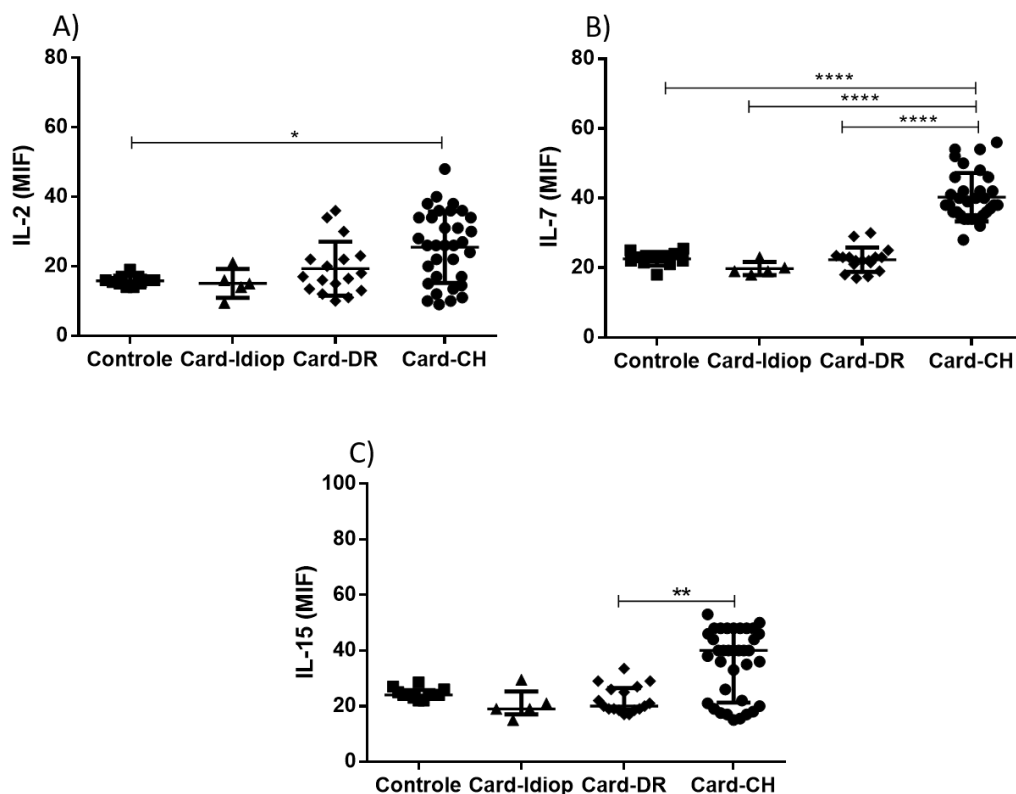
## 5.2 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas proliferativas

As citocinas IL-2, IL-7 e IL-15 atuam como fatores de crescimento para a diferenciação e sobrevivência de células T. Os dados da tabela 2 mostram a média e desvio padrão de cada molécula avaliada (IL-2 e IL-7), ou mediana e intervalo interquartil (IL-15) para cada grupo de estudo. Os dados referentes a tabela 2 estão demonstrados na figura 4 através do gráfico de dispersão.

Ao avaliar a expressão plasmática dessas moléculas, os dados demonstraram que os níveis de IL-2 foram maiores no grupo Card-CH em comparação ao grupo Controle (figura 4A). Não houve diferença entre os níveis observados em Card-CH e as demais cardiopatias, ou dessas com o grupo Controle. Os níveis plasmáticos da citocina IL-7 foram superiores na cardiopatia chagásica (Card-CH) em relação aos demais grupos de estudo (figura 4B), não havendo diferença entre as outras cardiopatias e o grupo Controle. Já os níveis plasmáticos da citocina IL-15 foram superiores na cardiopatia chagásica (Card-CH) apenas em relação ao grupo Card-DR (figura 4C). Não houve diferença entre Card-CH e os demais grupos, comparando-se os demais grupos entre si.

**Tabela 2:** Níveis plasmáticos de citocinas proliferativas. Os dados paramétricos foram expressos pela média e desvio padrão (IL-2, IL-7) e dados não paramétricos pela mediana e intervalo interquartil (IL-15).

Citocinas proliferativas	Controle	Card-Idiop	Card-DR	Card-CH
IL-2	15,86±1,45	15,10±4,12	19,35±7,74	25,52±10,29
IL-7	22,58±1,96	19,80±1,92	22,32±3,5	40,27±6,9
IL-15	24,00(23,25±2)	19,00(17,00±25,25)	20,00(18,75±26,50)	40,00(21,25±47,50)



**Figura 4:** Níveis plasmáticos de citocinas proliferativas: IL-2 (A), IL-7 (B) e IL-15 (C) em amostras de indivíduos do grupo Controle (n=13), com cardiopatias idiopática (Card-Idiop, n=5), reumática (Card-DR, n=17) e chagásica (Card-CH, n=38). Valores individuais foram expressos pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estaticamente significativos. \* significa  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  \*\*\* e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 5.3 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias

A inflamação é muito frequente em doenças crônicas e tem sido fortemente associada com a patogênese da insuficiência cardíaca. Além disso, muitos estudos sugerem que citocinas inflamatórias podem prever pior prognóstico em doenças cardiovasculares (FANOLA *et al.*, 2017; GULLESTAD; VINGE, 2012; KUMAR; MAULIK, 2017). Neste estudo, foi avaliado, os níveis de liberação plasmática das citocinas inflamatórias: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, IL-17, TNF e IFN- $\gamma$ . Os dados da tabela 3 representam a média e desvio padrão (IL-1 $\beta$ , IL12p70, IL-17 e TNF), ou mediana e intervalo interquartil (IL-6 e IFN- $\gamma$ ), para cada grupo de estudo. Os dados referentes a tabela 3 estão demonstrados na figura 5 através do gráfico de dispersão.

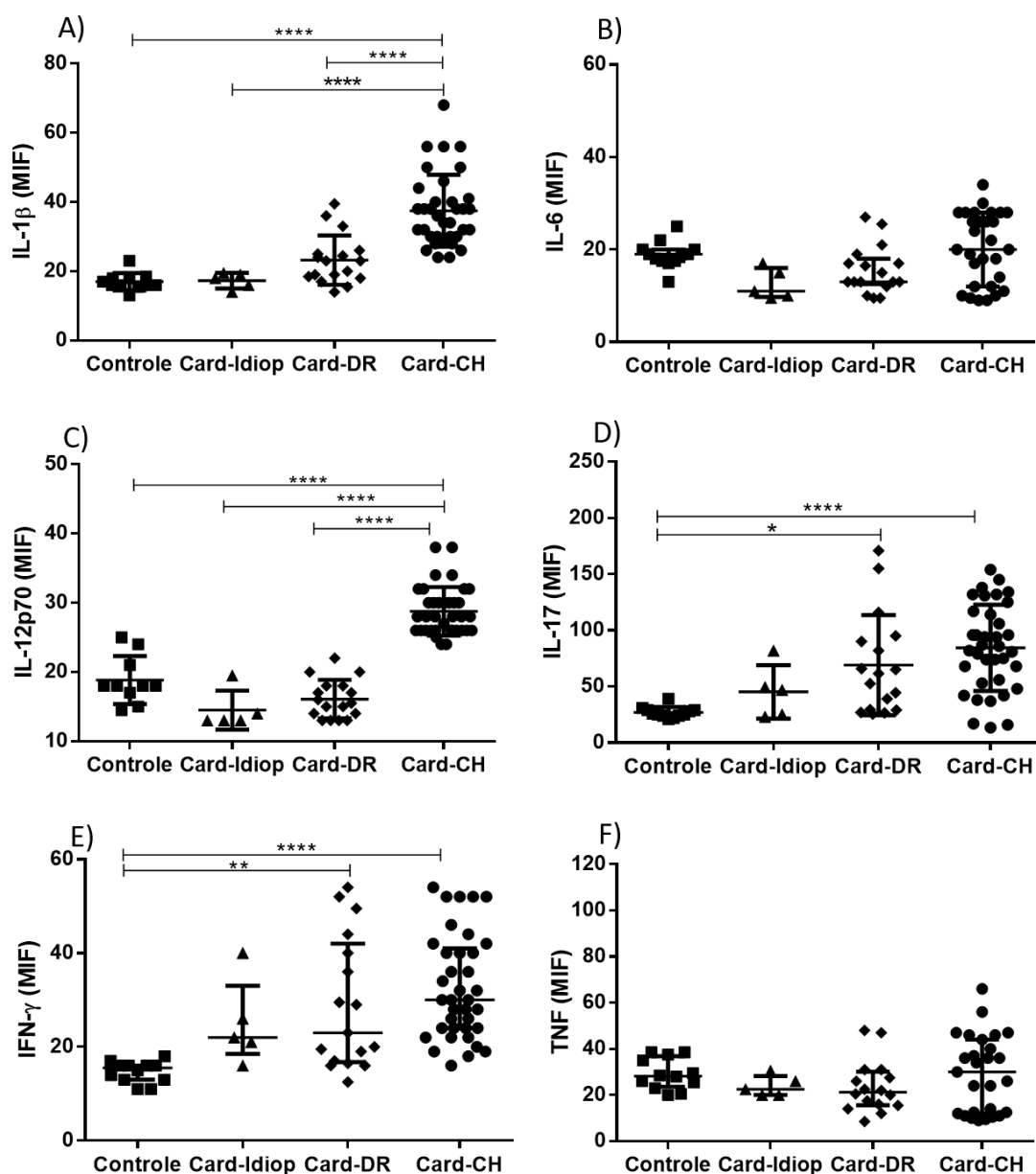
Neste estudo, a análise do perfil de citocinas inflamatórias demonstrou níveis aumentados de IL-1 $\beta$  (figura 5A) na cardiopatia chagásica em comparação à cardiopatia reumática, idiopática e o grupo controle. Nenhuma diferença foi observada entre o grupo Card-DR e o Card-Idiop, e entre estes e o grupo Controle.

A análise dos dados referente à citocina IL-6 (figura 5B) não demonstrou diferença significativa entre os grupos avaliados. Para a citocina IL-12p70 (figura 5C), níveis plasmáticos elevados foram observados no grupo Card-CH em relação aos demais grupos (Card-DR, Card-Idiop, Controle). Não houve diferença estaticamente significativa entre o grupo Card-DR e Card-Idiop, e entre essas cardiopatias e o grupo Controle, respectivamente.

Os níveis plasmáticos da citocina IL-17 foram aumentados no grupo Card-CH e Card-DR em relação ao grupo Controle. Não houve alterações em relação ao grupo Card-Idiop (figura 5D). De forma, semelhante, houve um aumento na liberação plasmática da citocina IFN- $\gamma$  no grupo Card-CH e Card-DR comparado ao grupo Controle, enquanto nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao grupo Card-Idiop (figura 5E). Curiosamente, nossos dados não evidenciaram diferenças significantes na secreção plasmática da citocina TNF (figura 5F).

**Tabela 3:** Níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias. Os dados paramétricos foram expressos pela média e desvio padrão (IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-17, TNF) e dados não paramétricos pela mediana e intervalo interquartil (IL-6, IFN- $\gamma$ ).

Citocinas inflamatórias	Controle	Card-Idiop	Card-DR	Card-CH
IL1- $\beta$	17,00 $\pm$ 2,50	17,30 $\pm$ 2,28	23,24 $\pm$ 7,14	37,49 $\pm$ 10,38
IL-6	13,00 (17,50 $\pm$ 20)	9,50 (9,750 $\pm$ 16)	9,50 (12,50 $\pm$ 18)	9,0 (12,00 $\pm$ 28)
IL-12p70	18,85 $\pm$ 3,48	14,50 $\pm$ 2,82	16,09 $\pm$ 2,78	28,78 $\pm$ 3,49
IL-17	26,92 $\pm$ 4,83	45,30 $\pm$ 23,86	69,12 $\pm$ 44,56	84,46 $\pm$ 38,34
TNF	29,21 $\pm$ 6,74	23,80 $\pm$ 4,48	23,69 $\pm$ 11,30	29,15 $\pm$ 16,59
IFN- $\gamma$	15,50 (13,00 $\pm$ 16)	22,00 (18,50 $\pm$ 33)	23,00 (16,75 $\pm$ 42)	30,00 (24,00 $\pm$ 41)



**Figura 5:** Níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias: IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), IL-12p70 (C), IL-17 (D), IFN- $\gamma$  (E), TNF (F) em amostras de indivíduos do grupo Controle (n=13), com cardiopatias idiopática (Card-Idiop, n=5), reumática (Card-DR, n=17) e chagásica (Card-CH, n=38). Valores individuais foram expressos pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. \* significa  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\* e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

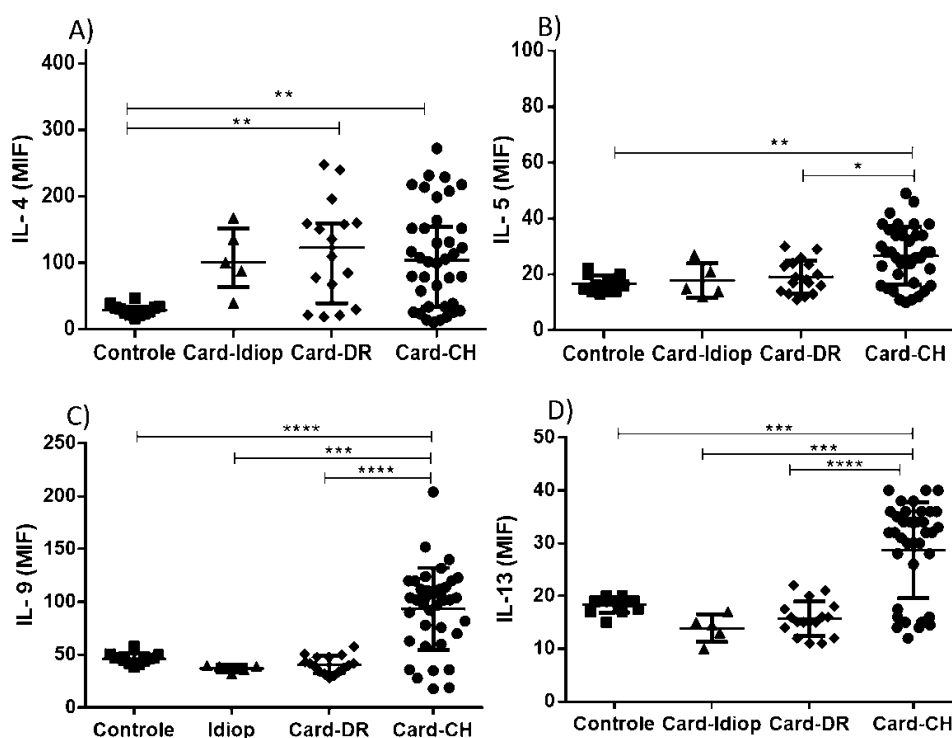
#### **5.4 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas derivadas de granulócitos e células Th2**

As citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 são moléculas produzidas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e granulócitos. Atuam principalmente na proliferação e diferenciação de células B e regulam a resposta inflamatória (CHEN *et al.*, 2016; MORRIS; GAUSE; FRED, 2000). O conhecimento dos níveis plasmáticos dessas moléculas pode evidenciar o perfil de modulação por citocinas Th1 e Th2 no ambiente sistêmico nas cardiopatias estudadas. Em nosso estudo, os dados da tabela 4 representam a média e desvio padrão de cada molécula, para cada grupo de estudo. Os dados referentes a tabela 4 estão demonstrados na figura 6 através do gráfico de dispersão.

Os dados evidenciaram que para a citocina IL-4 (figura 6A) houve um aumento nos níveis plasmáticos no grupo Card-CH e Card-DR comparado ao grupo Controle, no entanto, não houve alteração em relação ao grupo Card-Idiop. Além disso, os dados evidenciaram que não houve mudança significativa na liberação plasmática entre o grupo Card-idiop e o grupo Controle, no entanto, houve uma tendência de aumento. Para a citocina IL-5, nossos dados demonstraram aumento no grupo Card-CH em relação ao grupo Card-DR e Controle, entretanto, não houve mudança no perfil de secreção entre o grupo Card-Dr e Card-Idiop, e entre essas cardiopatias com o grupo Controle (figura 6B). Ao analisar os dados das citocinas IL-9 e IL-13, foi observado uma elevação nos níveis plasmáticos no grupo Card-CH em comparação aos demais grupos avaliados. No entanto, não houve alterações estaticamente significante, entre os grupos Card-DR e Card-Idiop, e entre tais cardiopatias e o grupo Controle (figura 6C e 6D).

**Tabela 4:** Níveis plasmáticos de citocinas derivadas de granulócitos e células Th2. Os dados paramétricos foram expressos pela média e desvio padrão

Citocinas derivadas de granulócitos/Th2	Controle	Card-Idiop	Card-DR	Card-CH
IL-4	29,50±8,42	106,6±48,6	117,6±75,61	109,2±74,65
IL-5	16,71±2,9	17,80±6,14	19,15±5,91	26,65±10,32
IL-9	46,42±5,11	37,20±3,27	40,97±8,35	93,46±38,79
IL-13	18,33±1,45	13,90±2,60	15,68±3,27	28,68±9,05



**Figura 6:** Níveis plasmáticos de citocinas derivadas de granulócitos ou células Th2: IL-4 (A), IL-5 (B), IL-9 (C), IL-13 (D) em amostras de indivíduos do grupo controle (n=13), com cardiopatias idiopática (Card-Idiop, n=5), reumática (Card-DR, n=17) e chagásica (Card-CH, n=38). Valores individuais foram expressos pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estaticamente significativos. \* significa  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  \*\*\* e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

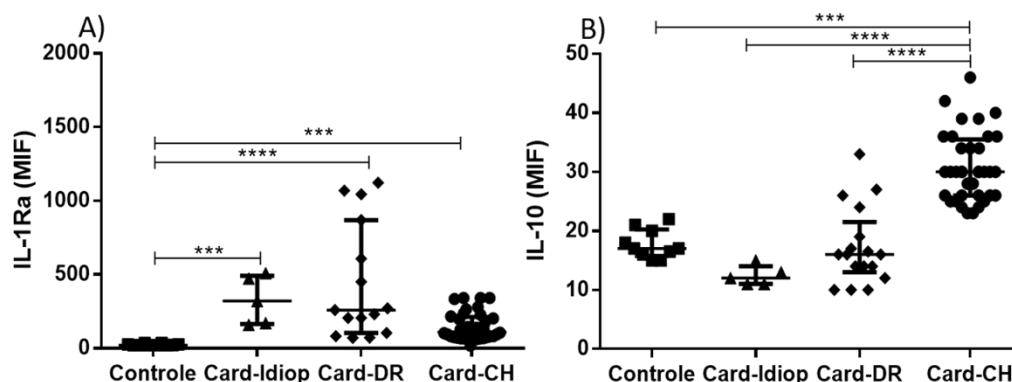
## 5.5 Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas regulatórias

As citocinas regulatórias são as principais moléculas responsáveis pelo controle da resposta inflamatória, em muitas doenças crônicas, restaurando a homeostase sistêmica e/ou tecidual (DINARELLO, 2009). No presente estudo, os dados da tabela 5 mostram a mediana e intervalo interquartil de cada molécula avaliada, para cada grupo de estudo. Os dados referentes a tabela 5 estão demonstrados na figura 7 através do gráfico de dispersão. Na figura 7A, é possível observar que todas as cardiopatias (chagásica, reumática e idiopática) apresentaram um aumento de IL-1Ra no plasma quando comparado com o grupo Controle. No entanto não houve diferença, nos níveis plasmáticos, quando comparado entre as cardiopatias.

Além disso, na figura 7B, é possível observar que o grupo Card-CH apresenta uma elevação de IL-10 no plasma quando se compara com as demais cardiopatias e o grupo Controle. Os dados evidenciaram, que não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos entre o grupo Card-DR versus Card-Idiop, e entre o grupo Card-Idiop versus Controle.

**Tabela 5:** Níveis plasmáticos de citocinas regulatórias. Os dados paramétricos foram expressos pela média e desvio padrão (IL-1Ra) e dados não paramétricos pela mediana e intervalo interquartil (IL-10),

Citocinas regulatórias	Controle	Card-Idiop	Card-DR	Card-CH
<b>IL-1Ra</b>	21,00 (21±25)	320 (164,5±491)	259,5 (104±869)	109 (73±212)
<b>IL-10</b>	17 (15,75±20,25)	12 (11±14)	16 (13±21,50)	30 (26±35,50)



**Figura 7:** Níveis plasmáticos de citocinas regulatórias: IL-1Ra (A) e IL-10 (B), em amostras de indivíduos do grupo controle (n=13), com cardiopatias idiopática (Card-Idiop, n=5), reumática (Card-DR, n=17) e chagásica (Card-CH, n=38). Valores individuais foram expressos pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. \* significa  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  \*\*\* e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 5.6 Avaliação dos níveis plasmáticos de quimiocinas

As quimiocinas são proteínas quimiotáticas fortemente associadas com o recrutamento de leucócitos para locais de lesão tecidual (RIDIANDRIES; TAN; BURSILL, 2018; TURNER *et al.*, 2014). No contexto de cardiopatias dilatadas podem ter papel na gravidade da doença. Em nosso trabalho, os dados da tabela 6 mostram média e desvio padrão de (CCL2, CCL5, CXCL10 e CCL11), e a mediana e intervalo interquartil das moléculas (CCL3, CCL4, CXCL8, CXCL10) para cada grupo de estudo. Os dados referentes a tabela 6 estão demonstrados na figura 8 e 9 através do gráfico de dispersão.

Neste estudo comparativo da expressão plasmática de quimiocinas, os dados demonstraram aumento significativo de CCL2 no grupo Card-CH em relação ao grupo Controle. Adicionalmente, alterações significativas, não foram observadas, em relação ao grupo Card-DR e Card-Idiop, e entre esses grupos e o Controle (figura 8A). De forma semelhante a CCL2, os níveis de CCL3 aumentaram apenas no grupo Card-CH em relação ao grupo Controle. Os dados não demonstraram alterações significativas comparado ao grupo Card-DR e Card-Idiop, e entre essas cardiopatias comparado ao grupo Controle (figura 8B).

Os níveis da quimiocina CCL4 foram maiores no grupo Card-CH e Card-DR em comparação ao grupo Controle. Não houve alterações em relação ao grupo Card-

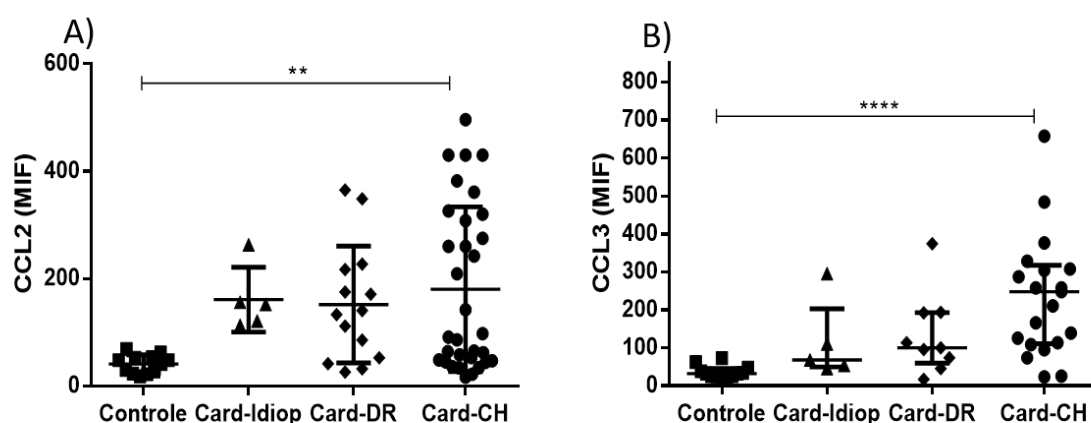
Idiop. Além disso, nenhuma mudança foi observada entre o grupo Card-CH versus Card-DR, Card-DR versus Card-Idiop, Card-Idiop versus grupo Controle (figura 9A). Os dados da molécula CCL5 demonstraram níveis aumentados no grupo Card-CH em relação aos demais grupos. Entretanto, não houve mudança no perfil de liberação entre o grupo Card-DR versus Card-Idiop, e entre estes e o grupo Controle (figura 9B).

Os dados das quimiocina CXCL8 evidenciaram aumento no grupo Card-CH em relação ao grupo Card-Idiop e o grupo Controle. Não foi observada, diferença estaticamente significativa comparado ao grupo Card-DR. Além disso, os dados não demonstraram alterações entre os grupos Card-DR versus Card-Idiop e Card-DR versus Controle; Card-Idiop versus Controle (figura 9C). Os dados da quimiocina CXCL10 evidenciaram níveis plasmáticos elevados no grupo Card-CH comparado ao grupo Card-DR e Controle. Não houve alterações significantes no grupo Card-DR versus Card-Idiop, e entre essas cardiopatias e o grupo Controle (figura 9D).

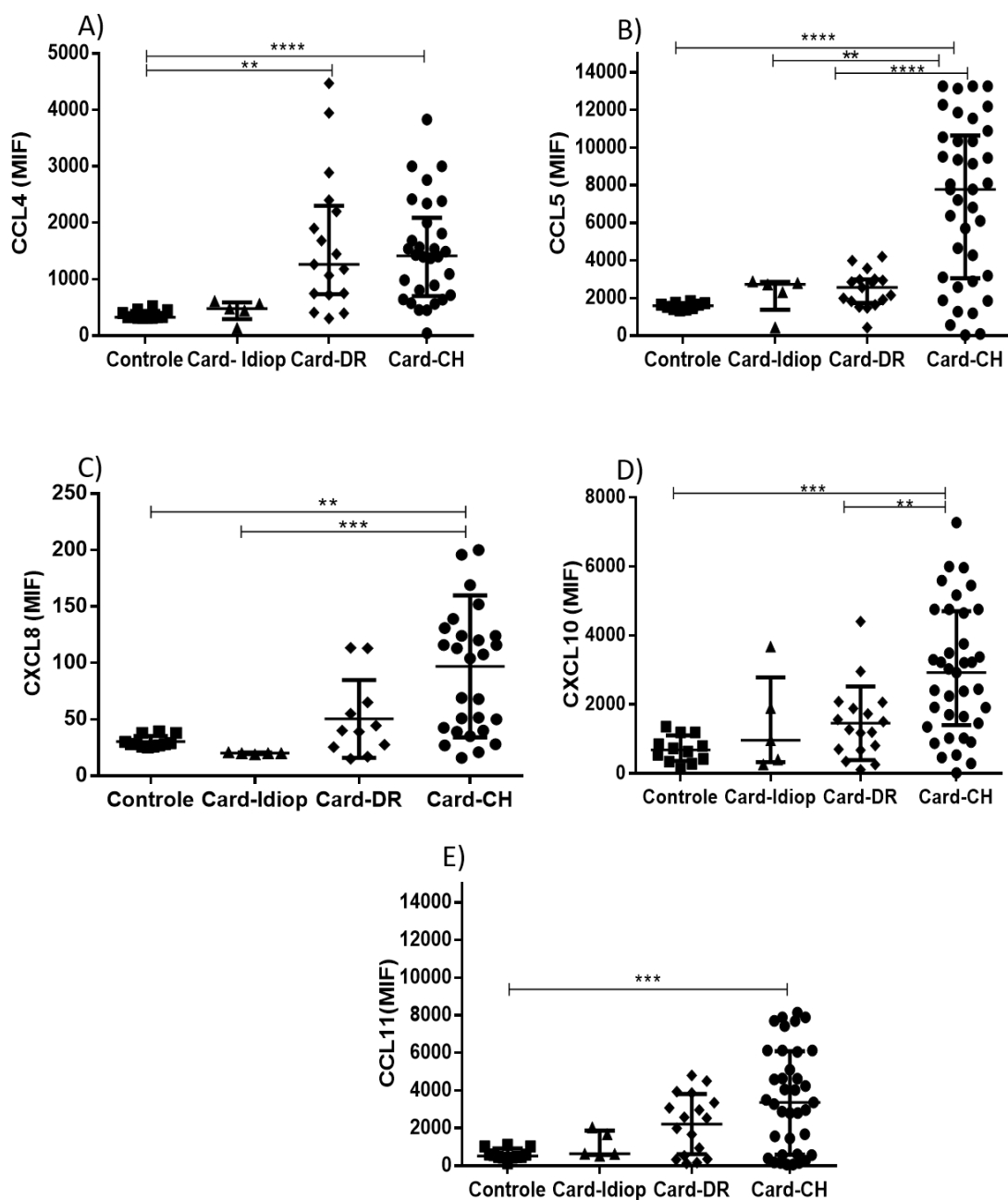
Referente a quimiocina CCL11, níveis elevados foram maiores apenas no grupo Card-CH comparado ao grupo Controle. A análise em relação ao grupo Card-DR e Card-Idiop não revelou diferença estaticamente significativa. Além disso, não houve diferença na liberação plasmática entre os grupos Card-DR e Controle, Card-Idiop e Controle (figura 9E).

**Tabela 6:** Níveis plasmáticos de quimiocinas. Os dados paramétricos foram expressos pela média e desvio padrão (CCL2, CCL5, CXCL10, CCL11) e dados não paramétricos pela mediana e intervalo interquartil (CCL3, CCL4, CXCL8),

Quimiocinas	Controle	Card-Idiop	Card-DR	Card-CH
<b>CCL2</b>	41,25±16,99	161±60,03	151,9±108,7	180,5±153,3
<b>CCL3</b>	32,50(25,13±45,63)	68(49,75±203)	100(60±193,3)	248(111±318)
<b>CCL4</b>	329(318,4±440,5)	480(292,5±588)	1265(735,5±2304)	1416(700,5±2088)
<b>CCL5</b>	1581±174	2239±1026	2468±979,6	7159±4252
<b>CXCL8</b>	28,00(26,25±36)	20,00(19,50±20,50)	40,00(25,50±65)	105,8(40,63±129,3)
<b>CXCL10</b>	708,4±386,7	1440±1405	1456±1066	2933±1860
<b>CCL11</b>	615,3±294,6	1109±703,4	2222±1598	3565±2693



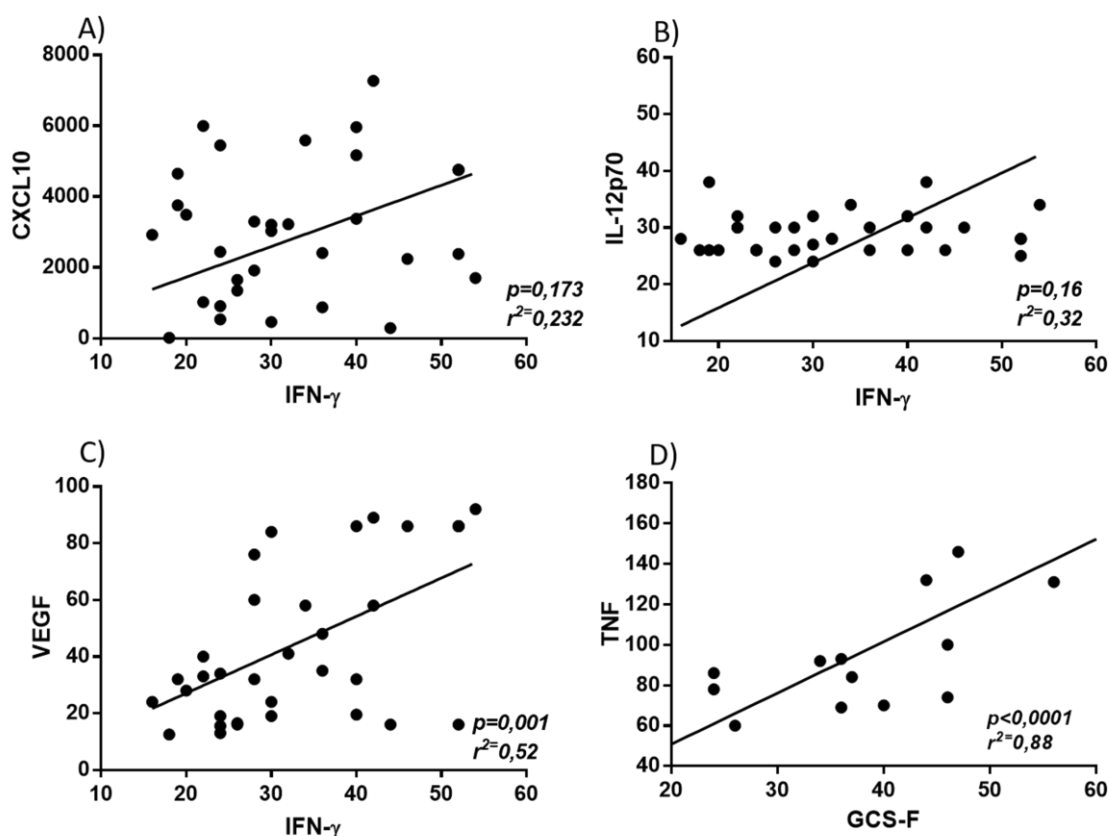
**Figura 8:** Níveis plasmáticos de CCL2 (A) e CCL4 (B), em amostras de indivíduos do grupo Controle (n=13), com cardiopatias idiopática (Card-Idiop, n=5), reumática (Card-DR, n=17) e chagásica (Card-CH, n=38). Valores individuais foram expressos pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estaticamente significativos. \* significa  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  \*\*\* e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



**Figura 9:** Níveis plasmáticos de quimiocinas: CCL4 (A), CCL5 (B), CXCL8 (C), CXCL10 (D), CCL11 (E) em amostras de indivíduos do grupo Controle (n=13), com cardiopatias idiopática (Card-Idiop, n=5), reumática (Card-DR, n=17) e chagásica (Card-CH, n=38), Valores individuais foram expressos pela média de intensidade de fluorescência (MIF). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estaticamente significativos, \* significa  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  \*\*\* e \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

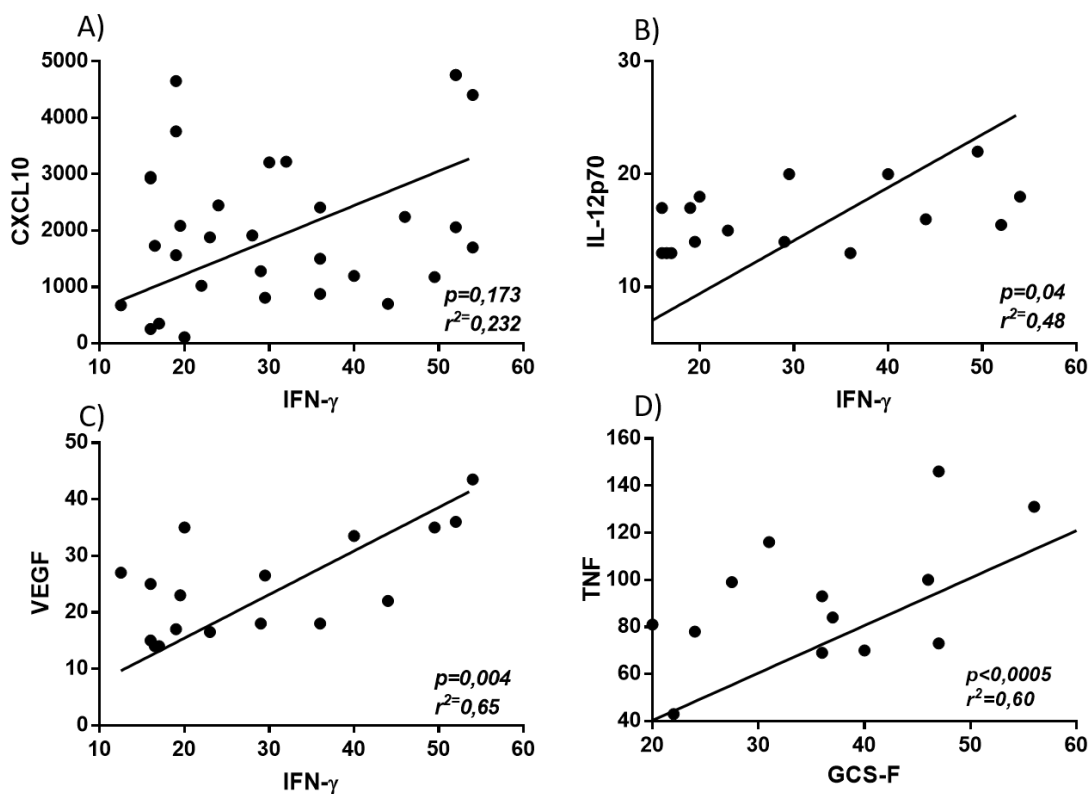
## 5.7 Análise de correlação entre quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento na cardiopatia chagásica e reumática,

Após avaliar os dados dos níveis plasmáticos dos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, realizamos análise de correlação entre diferentes moléculas para avaliar a interação entre elas, na cardiopatia chagásica e reumática. Foram selecionados fatores que apresentam associação funcional entre si, para isso foi avaliada, a interação entre a quimiocina CXCL10 e IFN- $\gamma$ , IL-12p70 e IFN- $\gamma$ , VEGF e IFN- $\gamma$ , e entre o GCS-F e TNF. Na figura 10, são representadas as análises de correlação na cardiopatia chagásica. Os dados indicam que não houve correlação estaticamente significativa entre a quimiocina CXCL10 com o IFN- $\gamma$  (figura 10A) e entre IL-12p70 com IFN- $\gamma$  (figura 10B). Interessantemente, houve uma correlação significativa entre o fator de crescimento VEGF com a citocina IFN- $\gamma$  (figura 10C;  $p=0,001$ ) e entre o G-CSF com a citocina TNF (figura 10 D;  $p<0,0001$ ).



**Figura 10:** Análise de correlação entre os níveis plasmáticos de CXCL10 e IFN- $\gamma$  (A), IL-12p70 e IFN- $\gamma$  (B), VEGF e IFN- $\gamma$  (C), GCS-F e TNF (D) em amostras de indivíduos com cardiopatia chagásica (card-CH n=38). Análise de correlação foi realizada pelo teste de Spearman. Valores de  $p<0,05$  foram considerados estaticamente significativos.

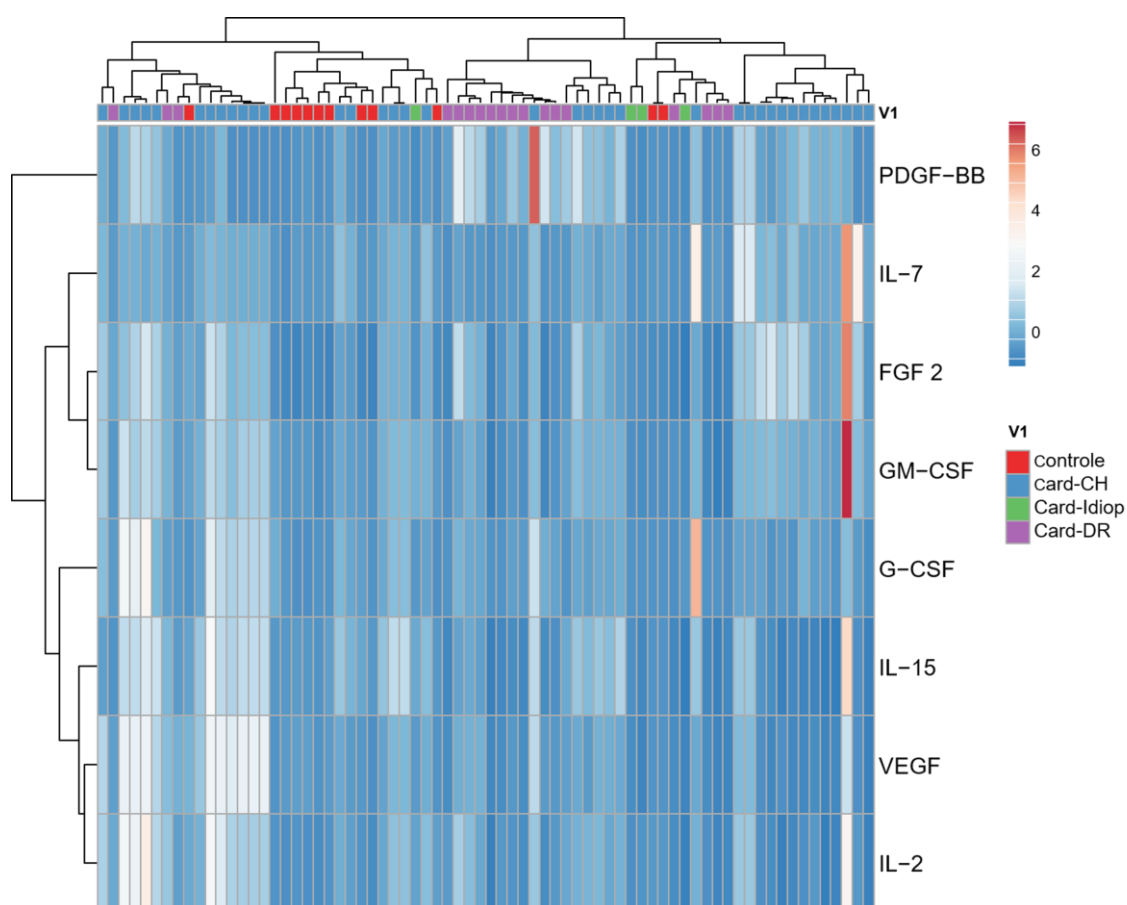
Na cardiopatia reumática, de forma semelhante com a cardiopatia chagásica, não houve correlação significativa entre CXCL10 e IFN- $\gamma$  (figura 11A), enquanto uma correlação significativa foi observada entre a citocina IL12p70 e IFN- $\gamma$  (figura 11B), VEGF com IFN- $\gamma$  (figura 11C), e entre o fator de crescimento G-CSF a citocina TNF (figura 11D).



**Figura 11:** Análise de correlação entre os níveis plasmáticos de CXCL10 e IFN- $\gamma$  (A), IL-12p70 e IFN- $\gamma$  (B), VEGF e IFN- $\gamma$  (C), GCS-F e TNF (D) em amostras de indivíduos com cardiopatia reumática (n=17). Análise de correlação foi realizada pelo teste de Spearman. Valores de  $p<0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

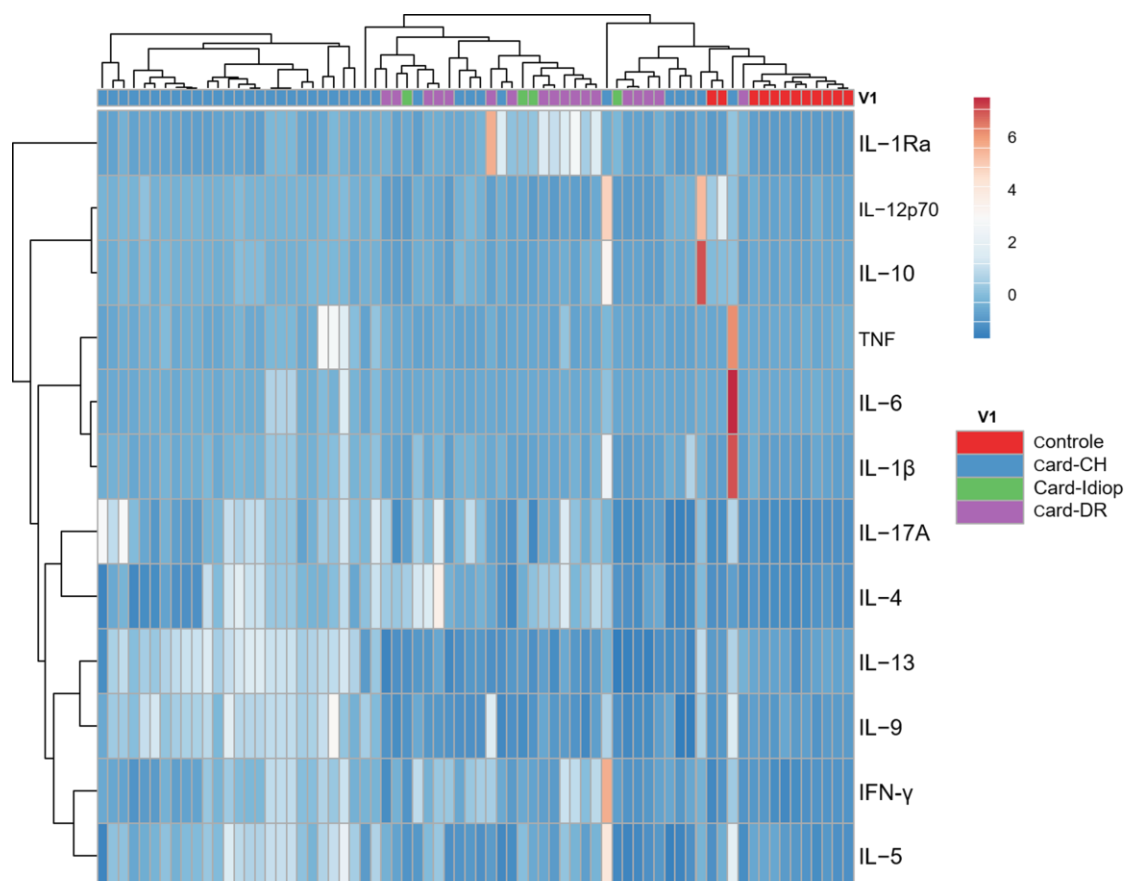
## 5.8 Análise representativa por mapa de calor (heat map) dos níveis plasmáticos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

Com a finalidade de identificar um possível padrão que diferencie os grupos avaliados, realizou-se análise representativa por mapa de calor (heat map). Foi possível observar que, embora fique clara uma similaridade entre indivíduos do mesmo grupo, há também heterogeneidade na distribuição dos indivíduos de todos os grupos. Além disso, pode-se notar que o PDGF-BB foi o fator de crescimento mais elevado na cardiopatia reumática. É importante destacar que houve variabilidade no grupo de indivíduos com cardiomiopatia chagásica. No dendograma de associação, foi encontrada proximidade entre FGF-2 e GM-CSF, e entre VEGF e IL-2 (figura 12).



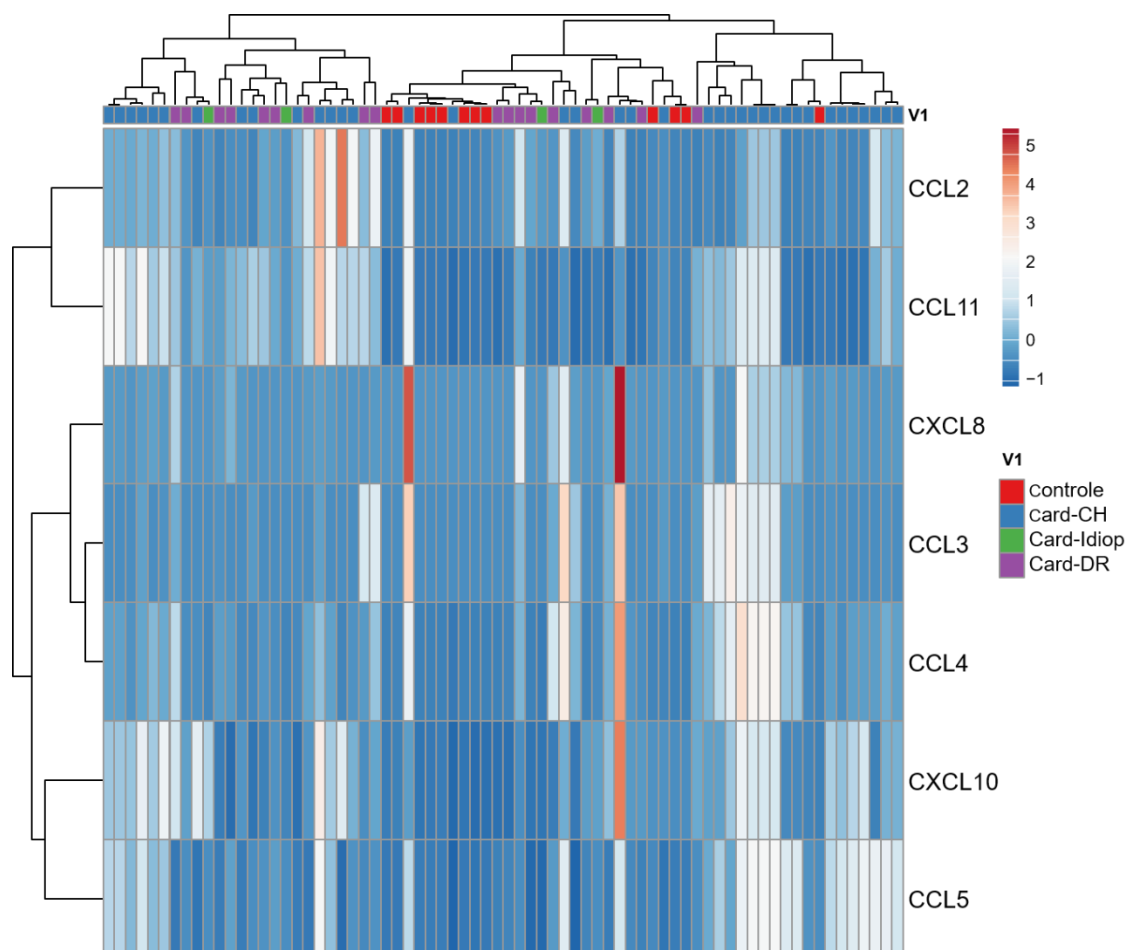
**Figura 12:** Análise por mapa de calor dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento na cardiopatia chagásica (Card-CH, azul), cardiopatia reumática (Card-DR, roxo), idiopática (card-Idiop, verde) e grupo Controle (vermelho). Linhas verticais representam cada amostra avaliada, e linhas horizontais representam cada molécula do estudo.

A análise representativa da dispersão em mapa de calor de citocinas (figura 13), demonstrou também heterogeneidade entre os grupos. No entanto, observa-se maior homogeneidade (em relação ao observado nos fatores de crescimento), sobretudo nos grupos Card-CH e Controle. De forma interessante, foram observadas fortes associações entre vários grupos de citocinas como IL-12 e IL-10, IL-6 e IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-4, IL-13 e IL-9, IFN- $\gamma$  e IL-5.



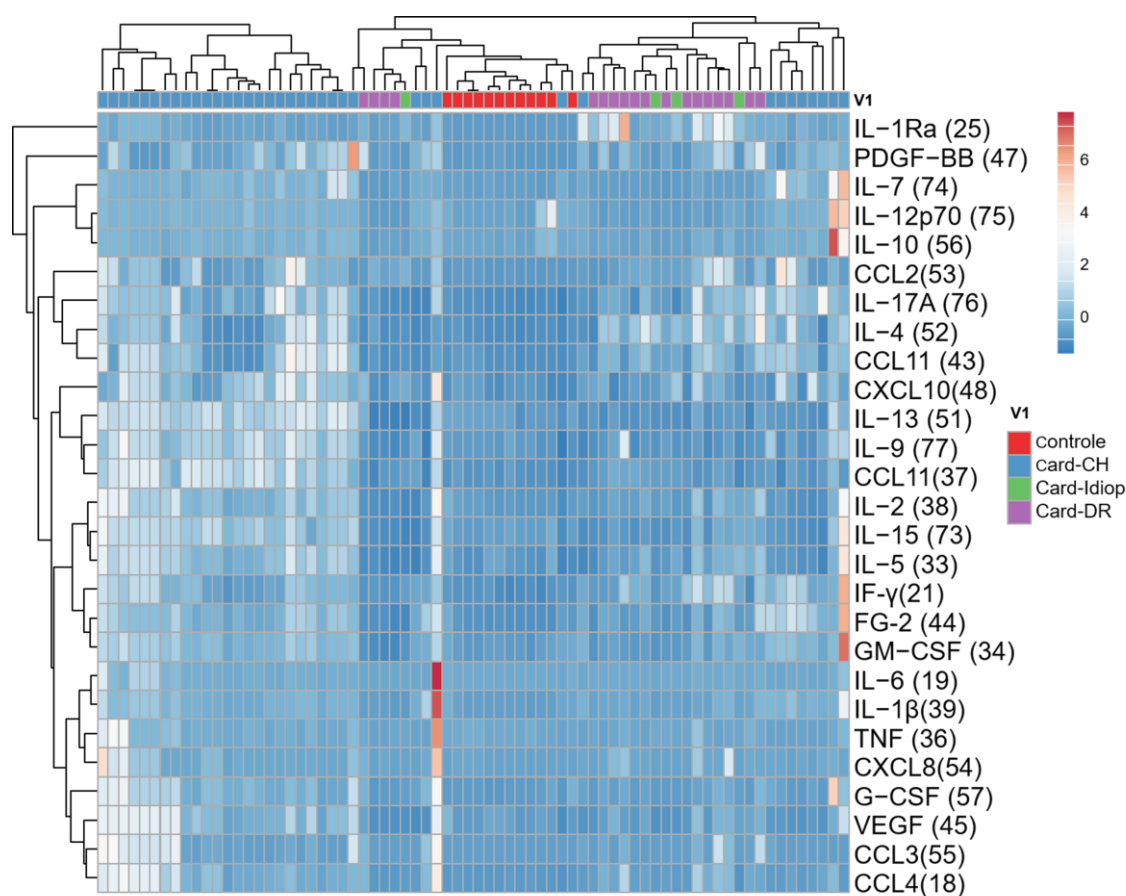
**Figura 13:** Análise por mapa de calor dos níveis plasmáticos de citocinas na cardiopatia chagásica (Card-CH, azul), cardiopatia reumática (Card-DR, roxo), idiopática (Card-Idiop, verde) e grupo Controle (vermelho). Linhas verticais representam cada amostra avaliada, e linhas horizontais representam cada molécula do estudo.

Os dados das quimiocinas (figura 14) demonstraram mais uma vez alta variabilidade na distribuição dos dados nos grupos. Encontrou-se forte associação entre CCL2 e CCL11, CCL3 e CCL4, CXCL10 e CCL5.



**Figura 14:** Análise geral por mapa de calor dos níveis plasmáticos de quimiocinas na cardiopatia chagásica (card-CH, azul), cardiopatia reumática (card-DR, roxo), idiopática (Card-Idiop, verde) e grupo Controle (vermelho). Linhas verticais representam cada amostra avaliada, e linhas horizontais representam cada molécula do estudo.

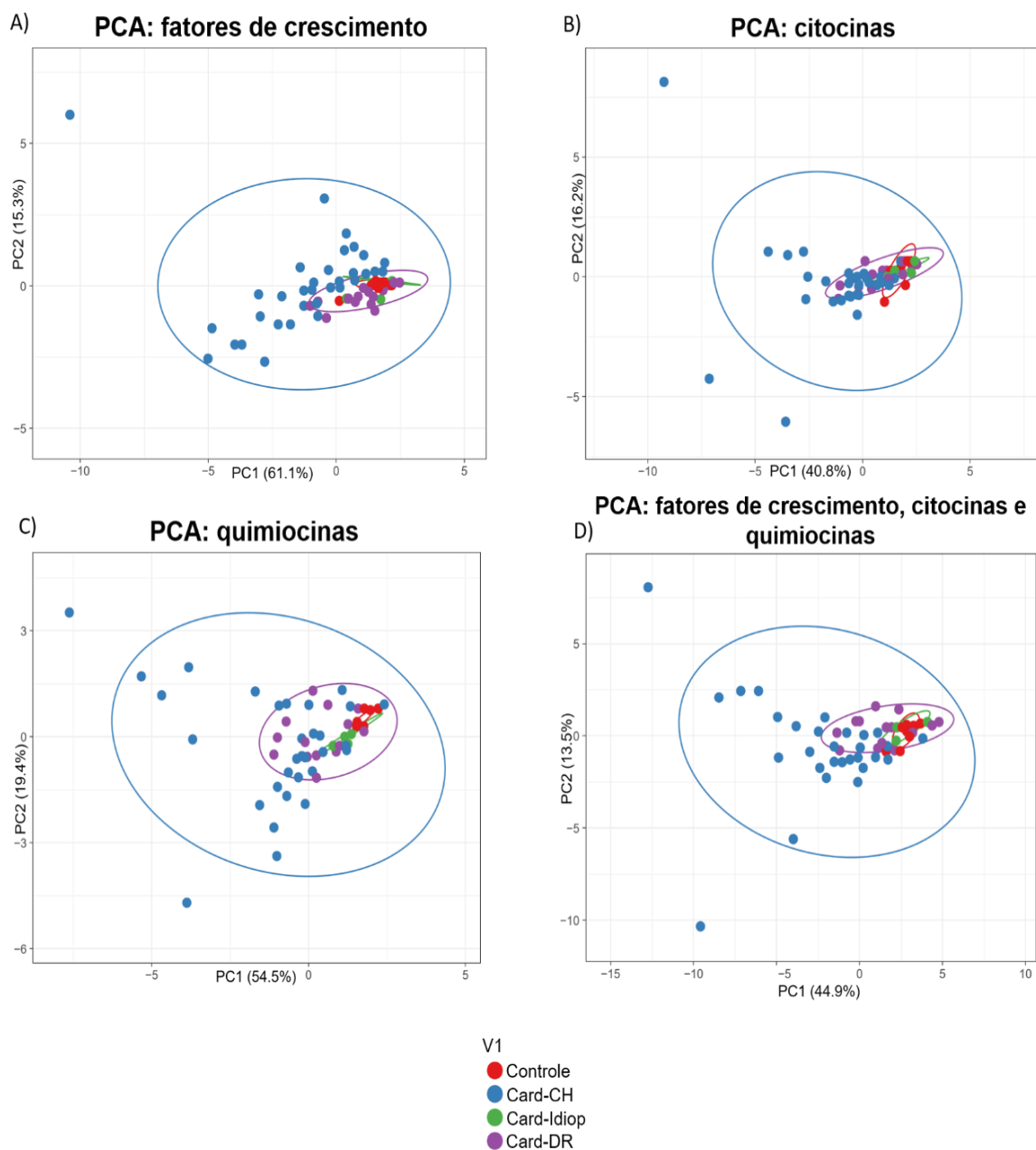
Na figura 15 é demonstrada uma visão geral do padrão de mediadores solúveis avaliados. Observa-se que, utilizando-se todos os marcadores analisados, há menor variabilidade dentro dos grupos, sobretudo nos grupos Controle, Card-DR, e Card-CH. O grupo de pacientes Card-Idiop ainda permaneceu bastante heterogêneo. Várias associações fortes observadas nos gráficos individuais foram mantidas (IL-12 e IL-10, FGF-2 e GM-CSF, IL-1 $\beta$  e IL-6, CCL3 e CCL4), e novas foram observadas (IL-4 e CCL11, IL-5 e IL-15).



**Figura 15:** Análise geral por mapa de calor dos níveis plasmáticos de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas na cardiopatia chagásica (Card-CH, azul), cardiopatia reumática (Card-DR, roxo), idiopática (Card-Idiop, verde) e grupo Controle (vermelho). Linhas verticais representam cada amostra avaliada, e linhas horizontais representam cada molécula do estudo.

### **5.9 Análise de componentes principais entre os níveis plasmáticos de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas entre os diferentes grupos de estudo**

Foi realizada análise de componentes principais (PCA) para cada grupo de mediadores solúveis individualmente (fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas) e análise geral associando todas as moléculas com os grupos avaliados. Na figura 16, observa-se que, independentemente da análise, não houve discriminação entre os grupos, baseando-se nos componentes principais de cada análise. Em geral, observa-se grande heterogeneidade no grupo dos pacientes chagásicos, cuja curva de distribuição engloba a de todos os demais grupos. As análises envolvendo apenas fatores de crescimento e quimiocinas (Figura 16 A e C) foram as que apresentaram efeitos mais significativos (76% e 73%, respectivamente, na soma dos dois componentes principais). No entanto, apesar dos valores serem mais baixos para as citocinas e o conjunto de todos os fatores (Figura 16B e D), observa-se padrão semelhante `aquele observado em fatores de crescimento e quimiocinas.

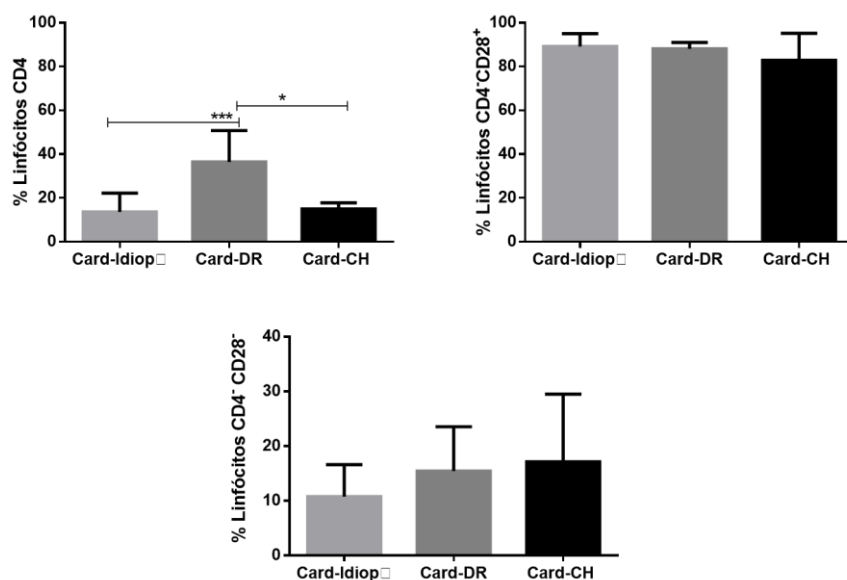


**Figura 16:** Análise por componentes principais (PCA) entre os mediadores solúveis e os grupos de estudo avaliados. PCA de fatores de crescimento (A), PCA de citocinas (B), PCA de quimiocinas (C), e entre todos os fatores solúveis (D). Círculos em vermelho representam o grupo Controle, em azul o grupo com cardiopatia chagásica, em verde com cardiopatia idiopática e em roxo com cardiopatia reumática.

## 6. Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> entre pacientes com cardiopatia chagásica, idiopática e reumática

Sabendo que as células T são as principais células da imunidade adaptativa, fortemente associadas com a liberação de citocinas imunorregulatórias e recrutamento para sítios inflamatórios, nosso próximo passo foi avaliar a frequência de diferentes subpopulações de células T.

Na figura 17 é possível observar que no grupo Card-DR, houve um aumento significativo na frequência de células CD4<sup>+</sup> totais, em comparação ao grupo Card-Idiop e Card-CH. No entanto, não houve alterações na frequência entre o grupo Card-Idiop e Card-CH. A análise dos dados da subpopulação CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> revelou que não há diferenças significativas entre os grupos avaliados. Da mesma forma, não houve diferença estatisticamente significativa na subpopulação CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, embora os dados indiquem uma tendência de aumento no grupo Card-CH e Card-DR comparado ao card-Idiop.

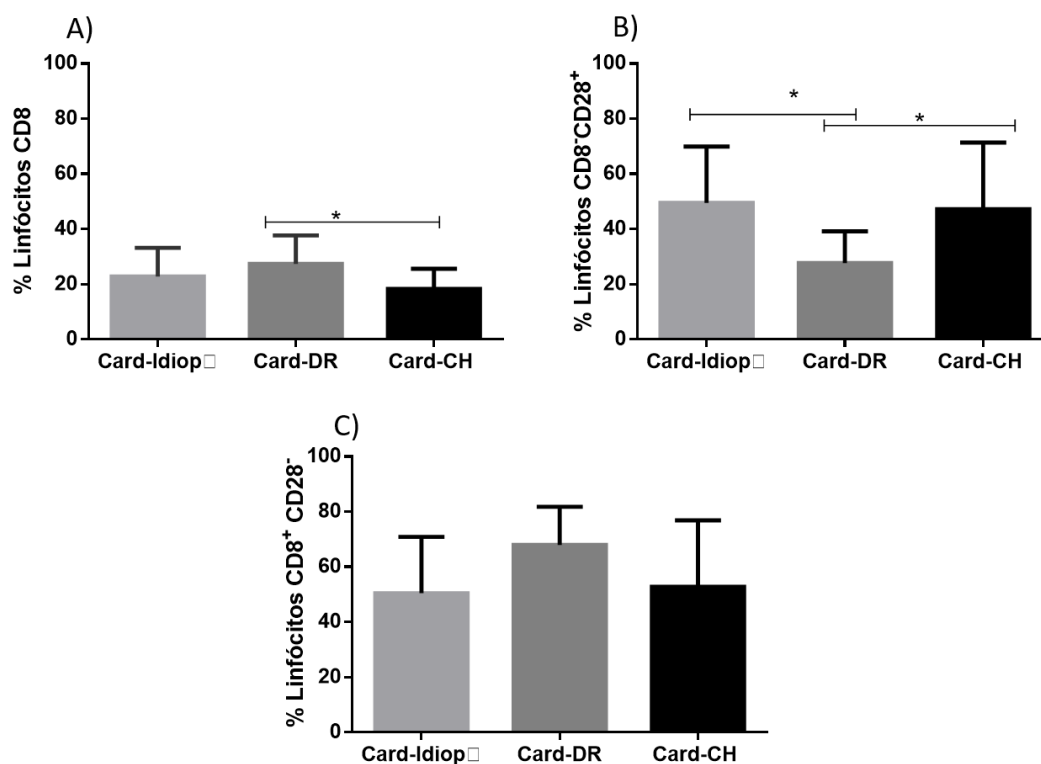


**Figura 17:** Análise da frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> totais, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com cardiopatias idiopática (Card-Idiop, n=9), reumática (Card-DR, n=12) e chagásica (Card-CH, n=14). Os valores estão expressos como a média +/- desvio padrão do percentual referente à frequência das diferentes subpopulações. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 6.1 Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre pacientes com cardiopatia chagásica, idiopática e reumática

Nossos dados evidenciaram aumento significativo na frequência de células CD8<sup>+</sup> totais no grupo Card-DR comparado ao grupo Card-CH. Não houve diferença entre o grupo Card-DR comparado ao Card-Idiop, e entre o Card-Idiop em relação ao Card-CH. Os dados foram representados na figura 18A.

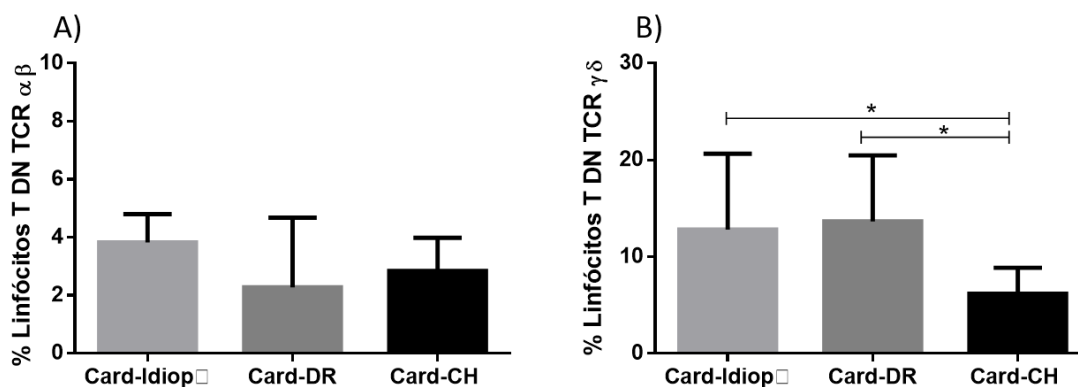
Além disso, foi observada redução na subpopulação CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> no grupo (Card-DR) comparado ao grupo Card-Idiop e Card-CH. Os dados não indicaram diferença entre o grupo Card-Idiop e Card-CH (figura 18B). Na figura 18C é possível observar que não houve alterações na frequência da subpopulação CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> entre os grupos avaliados, no entanto, houve tendência de aumento no grupo Card-DR em relação aos demais grupos.



**Figura 18:** Análise da frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> totais (A), CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> (B) CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (C), em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com cardiopatias idiopática (Card-Idiop, n=9), reumática (Card-DR, n=12) e chagásica (Card-CH, n=14). Os valores estão expressos como a média +/- desvio padrão do percentual referente à frequência das diferentes subpopulações. Valores de p<0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

## 6.2 Comparação da frequência de subpopulações de linfócitos T duplo negativos ( $CD4^+CD8^-$ ) expressando os receptores de células T (TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ ) em pacientes com cardiopatia chagásica, idiopática e reumática

O papel de células T duplo negativas é pouco relatado em cardiopatias. Neste estudo, os dados evidenciaram que não houve alterações na frequência de células T duplo negativas expressando TCR  $\alpha\beta$  (figura 19A). De forma interessante, houve aumento na frequência do TCR  $\gamma\delta$  nos grupos Card-DR e Card-Idiop comparado ao grupo Card-CH. Nenhuma diferença foi observada entre o grupo Card-DR e Card-Idiop (figura 19B).



**Figura 19:** Análise da frequência de células T duplo negativas expressando os receptores de células T (TCR)  $\alpha\beta$  (A) e TCR  $\gamma\delta$  (B) em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com cardiopatias idiopática (Card-Idiop, n=9), reumática (Card-DR, n=12) e chagásica (Card-CH, n=14). Os valores estão expressos como a média +/- desvio padrão do percentual referente à frequência das diferentes subpopulações. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estaticamente significativos,

## 7. DISCUSSÃO

A insuficiência cardíaca é o principal desfecho clínico em diferentes cardiopatias, incluindo a doença cardíaca isquêmica, hipertensão, cardiomiopatias e doença valvular. Nessas condições, o fluxo sanguíneo fornecido pelo coração é insuficiente para atender as necessidades metabólicas e atender o retorno venoso sistêmico (KEMP; CONTE, 2012). A maioria dos estudos nessas doenças envolvem avaliação de parâmetros clínicos como fração de ejeção do ventrículo esquerdo, menor pressão sistólica da artéria pulmonar, envolvimento biventricular extenso, aneurisma ventricular apical e taquicardia ventricular não sustentada, sendo estes indicadores de gravidade da doença (BARBOSA *et al.*, 2011; BESTETTI; MUCCILLO, 1997; NUNES *et al.*, 2010; RASSI; 2007). Algumas cardiopatias, como a chagásica, estão associadas com uma forte ativação imunológica. Neste contexto, propusemos a avaliar moléculas associadas à resposta imunológica entre as cardiopatias: idiopática (sem causa definida), a cardiopatia reumática e a chagásica. Foram avaliados níveis plasmáticos de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e a frequência de subpopulações de linfócitos T circulantes. Nossos dados mostraram que a cardiopatia chagásica é associada com a maior produção em mais de 60% dos fatores solúveis avaliados, apontando para uma característica altamente ativadora dessa cardiopatia, em relação às demais o que demonstra que estes fatores são singulares da cardiopatia chagásica. Por outro lado, algumas similaridades também foram encontradas, indicando fatores associados às cardiopatias, independentemente da causa. Esses achados serão fundamentais para compreender melhor as características imunológicas das cardiopatias e com isso, nortear estratégias que visam reduzir a inflamação nessas doenças, em especial a cardiopatia na doença de Chagas que apresentou grande variedade de fatores associados à doença.

O papel de fatores de crescimento já foi descrito em doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio e doença cardíaca isquêmica. Nessas condições, essas moléculas regulam a sobrevivência de cardiomiócitos, o aumento da contratilidade celular, angiogênese, proliferação e diferenciação de células endoteliais e células musculares lisas (HENNING, 2016). Por outro lado, a produção de fatores de crescimento por fibroblastos, células endoteliais, células do sistema imune, entre outras células, podem contribuir para a formação de fibrose tecidual, muito comum em

cardiopatias, e associada com o desenvolvimento e agravamento da doença (GALLINI *et al.*, 2016; TAIMEH *et al.*, 2013).

Em nosso trabalho, observou-se que os fatores de crescimento G-CSF, GM-CSF, FGF-2, VEGF e PDGF-BB apresentaram níveis plasmáticos elevados no grupo Card-CH quando comparado aos demais grupos. O fator estimulante de colônia de granulócitos (GCS-F) é um importante regulador da proliferação e diferenciação de neutrófilos, produção e maturação de células mieloides. Além disso, pode alterar o perfil de citocinas de Th1 para Th2 (MACDONALD *et al.*, 2003).

Estudos anteriores demonstraram que a administração de G-CSF pode induzir a produção de mediadores anti-inflamatórios e reduzir a fibrose em modelo experimental de doença de Chagas crônica (MACAMBIRA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2018). Adicionalmente, a produção de G-CSF pode ser induzida por citocinas inflamatórias como o TNF e IL-1 $\beta$ , elevando seus níveis circulantes durante processos infecciosos (KAWAKAMI *et al.*, 1964). Corroborando estes estudos, nossos resultados mostraram correlação positiva entre a produção de TNF e G-CSF nas cardiopatias chagásica e reumática (figura 10 e 11D). É possível que os níveis elevados de G-CSF estejam associados à elevada produção de TNF, já descrita em pacientes com cardiopatia chagásica e associada com o grau de disfunção cardíaca (SOUZA *et al.*, 2004; TALVANI *et al.*, 2004). Embora o G-CSF tenha sido associado à redução de fibrose no modelo experimental da infecção pelo *T. cruzi*, deve-se considerar que há diferenças importantes da doença crônica humana para o modelo experimental. Além disso, não foi definido, em nosso trabalho, o grau de fibrose das cardiopatias estudadas, nem o grau de fibrose dentre os cardiopatas com doença de Chagas. Estudos considerando este parâmetro seriam informativos em relação ao papel de G-CSF.

O GM-CSF (fator estimulante de colônia de macrófagos/granulócitos) é uma molécula produzida por células T, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, essencial para a produção, proliferação, diferenciação e sobrevivência de leucócitos (BECHER; TUGUES; GRETER, 2016; PETER.; FONG, 2017; LAAN *et al.*, 2003; SHIOMI; USUI, 2015; MCDERMOTT *et al.*, 2014). Em condições fisiológicas normais, os níveis séricos de GM-CSF são baixos, no entanto, sua produção aumenta em condições inflamatórias (HAMILTON; ANDERSON, 2004). Longhi *et al.*, (2014) avaliaram os níveis de GM-CSF no sobrenadante de células mononucleares de

sangue periférico de pacientes chagásicos cardiopatas, e observaram aumento dessa molécula, após estímulo com proteínas ribossômicas de *T. cruzi* (LONGHI *et al.*, 2014). Em nosso trabalho (figura 3B) foi possível observar que, mesmo sem estímulo *in vitro*, os pacientes com cardiopatia chagásica (Card-CH) apresentaram níveis elevados de GM-CSF, quando comparado às demais cardiopatias e ao grupo controle, sendo essa uma característica da cardiopatia na doença de Chagas. Esses dados sugerem, que a infecção crônica por *T. cruzi*, pode manter níveis circulantes elevados de GM-CSF, em pacientes cardiopatas, contribuindo para manutenção da resposta inflamatória sistêmica por leucócitos circulantes.

O PDGF-BB, produzido principalmente por macrófagos, plaquetas e fibroblastos, pode contribuir para a formação de fibrose tecidual cardíaca (GALLINI *et al.*, 2016; KLINKHAMMER; FLOEGE; BOOR, 2018). Reis e colaboradores relataram a associação desse fator de crescimento com lesões proliferativas e fibrose no coração de pacientes com cardiopatia chagásica (REIS *et al.*, 2000). Nossos dados demonstraram elevação nos níveis plasmáticos de PDGF-BB no grupo Card-DR e Card-CH quando comparado ao grupo Card-Idiop e o grupo Controle, o que pode sugerir sua contribuição na indução de dano cardíaco nessas cardiopatias secundárias à infecção bacteriana e parasitária (figura 3E). Em nosso trabalho, não foi realizado estudo de correlação, entre os níveis de PDGF-BB e parâmetros de disfunção cardíaca. No entanto, a liberação plasmática dessa molécula no ambiente sistêmico por diversas fontes celulares, pode sugerir um possível efeito fibrótico encontrado no tecido valvar e cardíaco dos pacientes com cardiopatia reumática e chagásica, respectivamente.

A análise dos níveis da molécula FGF-2 evidenciou maior produção em indivíduos com cardiopatia chagásica (figura 3C). Estudos em modelos animais demonstraram que esse fator de crescimento pode induzir hipertrofia e fibrose cardíaca (HOUSE *et al* 2010; VIRAG *et al.*, 2007). A família FGF é constituída por 18 proteínas de sinalização, importantes para o processo de angiogênese, crescimento e diferenciação celular. Dentre as moléculas da família FGF, o FGF-2 é predominantemente expresso em cardiomiócitos, células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos no coração (KARDAMI *et al.*, 2007; ORNITZ; ITOH, 2015). Nossos resultados indicam um possível papel de FGF-2 para a gravidade da cardiopatia chagásica. A liberação aumentada dessa molécula observada no plasma

no presente estudo pode persistir pelas fontes celulares encontradas no tecido cardíaco desses pacientes cardiopatas.

A produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é regulada por células epiteliais, células musculares lisas, macrófagos e células T (ANGELO; KURZROCK, 2007). É importante para o processo de angiogênese, quimiotaxia de células T e co-estimulação da produção de IFN- $\gamma$ , sugerindo seu papel como molécula pró-inflamatória (BASU *et al.*, 2010).

Nossos resultados evidenciaram um aumento nos níveis de VEGF no grupo Card-CH e adicionalmente, uma correlação significativa foi observada entre a produção de VEGF e IFN- $\gamma$  nas cardiopatias chagásica e reumática (figura 3D,10C,11C, respectivamente). A análise de dendograma por mapa de calor evidenciou associação entre VEGF e a citocina IL-2. As células T ativadas por IL-2, em resposta a estimulação antigênica, podem induzir a produção de VEGF e um fenótipo celular de células Th1 associado com a inflamação (MOR; QUINTANA; COHEN, 2014). Nossos dados sugerem, portanto, que esse fator de crescimento pode contribuir para o ambiente inflamatório sistêmico observado em pacientes com cardiopatia chagásica, modulando a produção de citocinas da resposta Th1, como o IFN- $\gamma$ . Além disso, a associação entre VEGF e IL-2, indica um possível papel de células T, na produção dessa molécula.

Os nossos dados demonstraram a relevância dos fatores de crescimento avaliados que se associam com a resposta imune em pacientes com cardiopatia chagásica. Os resultados indicam uma possível contribuição para a patogênese da doença, principalmente pela indução da inflamação e fibrose tecidual, pela deposição de colágeno e matriz extracelular no tecido cardíaco (MEDAMANA; CLARK; BUTLER, 2016; TAIMEH *et al.*, 2013). Estudos de associação entre essas moléculas e parâmetros clínicos de função cardíaca poderá trazer informações mais detalhadas sobre o papel desses fatores em doenças cardíacas.

De forma semelhante aos fatores de crescimento, as citocinas proliferativas atuam principalmente na diferenciação e proliferação celular (TURNER *et al.*, 2014). Nossos dados demonstraram que a liberação plasmática de IL-2, IL-7 e IL-15 são predominantes na cardiopatia chagásica. Fonseca e colaboradores, demonstraram a importância dessas moléculas para a expansão de células CD8 *in vitro*, manutenção e sobrevivência de células T infiltrantes no coração de pacientes cardiopatas crônicos

(FONSECA *et al.*, 2007). Os níveis séricos aumentados de IL-2 já foram descritos e associados com a função cardíaca comprometida (WARD *et al.*, 1999). Nossos dados demonstraram, que em concordância com os achados, encontrados no tecido cardíaco de pacientes com cardiopatia chagásica, os níveis de IL-7 e IL-15 também estão aumentados no plasma de indivíduos com essa mesma condição clínica. Essas moléculas podem estar associadas com a função e o desenvolvimento de células T CD4+ e CD8+ circulantes, contribuindo para a patogênese da cardiopatia chagásica.

As citocinas pró inflamatórias são importantes mediadoras da insuficiência cardíaca em doenças cardiovasculares (DOMINGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2006; ZARROUK-MAHJOURB *et al.*, 2016). Essas moléculas são liberadas em resposta a lesões no miocárdio, como mecanismo de reparação tecidual, agindo localmente ou de maneira sistêmica, e a longo prazo, são responsáveis pela disfunção cardíaca (BARTEKOVA *et al.*, 2018; MANN, 2002; ZARROUK-MAHJOURB *et al.*, 2016). Neste estudo, foi demonstrado que os níveis plasmáticos das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-12p70 foram elevados na cardiopatia chagásica (figura 5A, 5C), enquanto as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-17 aumentaram a liberação plasmática na cardiopatia chagásica e reumática (figura 5D e 5E). Diversos estudos já relataram, o aumento de citocinas inflamatórias em pacientes com cardiopatia chagásica, demonstrando o potencial dessas moléculas como fatores para a progressão e manutenção da cronicidade da doença (COSTA *et al.*, 2009; CUNHA-NETO, E. *et al.*, 1998; CUNHA-NETO, E. *et al.*, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2004; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2008).

Nossos dados reforçam o papel de citocinas com potencial pró inflamatório para a patogênese da doença de Chagas. Na infecção aguda, IFN- $\gamma$  induz a via de sinalização STAT-1 e inibe o crescimento de amastigotas intracelulares (STAHL *et al.*, 2014). No entanto, na fase crônica, sua secreção correlaciona-se positivamente com a morbidade da doença pelo desenvolvimento de cardiopatia severa devido ao efeito pró inflamatório exacerbado (GOMES *et al.*, 2003). Adicionalmente, a expressão de IL-12 em CMSPs de pacientes com cardiopatia chagásica já foi associada com a capacidade citotóxica, possivelmente pela propriedade ativadora de células NK e células T (BRODSKYN *et al.*, 1996). Por outro lado, estudos recentes, atribuíram papel protetor para a IL-17 na doença de Chagas, onde a expressão dessa citocina foi correlacionada com uma melhor função cardíaca em pacientes cardiopatas (CAMARA *et al.*, 2019; MAGALHÃES *et al.*, 2013).

A associação de IL-17 com a cardiopatia reumática já foi demonstrada em modelo experimental, em que ratos infectados com *Streptococcus A*, aumentaram significativamente as concentrações séricas e teciduais de IL-17 na valva mitral. Adicionalmente, estudos já demonstraram níveis elevados dessa citocina no plasma de indivíduos com estenose mitral reumática (BILIK *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2015). Em concordância, com esses achados, nossos resultados corroboram com a importância da IL-17 para a patogênese da cardiopatia reumática. De forma complementar, os níveis aumentados de IFN- $\gamma$  podem contribuir com a resposta inflamatória exacerbada. Guilherme *et al.* (2004), relataram que a manutenção do dano tecidual valvar está associada com a secreção de IFN- $\gamma$  por células T infiltrantes em pacientes com cardiopatia reumática. Esse achado reforça o papel da citocina IFN- $\gamma$ , como principal mediadora da resposta inflamatória exacerbada, já relatada na cardiopatia chagásica.

Nossos dados demonstraram, portanto, que diversas citocinas inflamatórias estão aumentadas na cardiopatia chagásica, essas moléculas podem contribuir para patogênese e gravidade da doença, pelo estímulo inflamatório contínuo durante a infecção crônica. Além disso, é importante destacar, que a citocina IL-17 pode exercer efeitos opostos de acordo com a etiologia da cardiopatia. Na cardiopatia chagásica, associa-se com a função protetora, enquanto na cardiopatia reumática está relacionada com a resposta patogênica.

As citocinas regulatórias são importantes para a modulação da resposta inflamatória e homeostase tecidual e sistêmica (DINARELLO, 2009). De forma interessante, nossos dados evidenciaram aumento na liberação plasmática da citocina IL-1Ra em todas as cardiopatias quando comparado com o grupo Controle (Card-Idiop, Card-DR e Card-CH-figura 7A). A liberação dessa molécula pode ser associada com o nível de inflamação, pois é secretada para a modulação das atividades de IL-1 $\beta$  (FISCHER *et al.*, 1992). Elevação nos níveis de IL-1Ra já foi descrita em outras cardiopatias e curiosamente foi associada com a necrose miocárdica em pacientes com infarto do miocárdio (PATTI *et al.*, 2004; PATTI *et al.*, 2005).

Para a citocina IL-10, nossos dados demonstraram aumento apenas na cardiopatia chagásica (Card-CH figura 4B), em relação aos demais grupos avaliados. Vários estudos já foram realizados para avaliação dessa molécula, sendo a maioria deles comparando com a forma clínica indeterminada, e evidenciando aumento nesta

forma clínica (SOUSA *et al.*, 2014). Neste trabalho, foi evidenciado que há um aumento nos níveis plasmáticos de IL-10 também na forma cardíaca, e que essa molécula é regulada positivamente em comparação com as cardiopatias avaliadas. Apesar de estar presente na cardiopatia chagásica, o ambiente predominantemente inflamatório pode ser superior aos efeitos modulatórios, observados por essa citocina em indivíduos chagásicos assintomáticos da forma clínica indeterminada.

Adicionalmente, uma outra análise realizada neste estudo, foi o perfil de secreção plasmática de citocinas produzidas por granulócitos e por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, responsáveis pela resposta imune Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13). Essas moléculas estão associadas principalmente com a diferenciação de células B, diferenciação e ativação de eosinófilos, e por isso associam-se com a resposta a agentes alérgenos (DUNICAN; FAHY, 2015). Em nosso estudo foi observado aumento da citocina IL-4 no grupo Card-CH e Card-DR comparado ao grupo Controle (figura 6A). Trata-se de uma citocina produzida principalmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, basófilos, mastócitos e eosinófilos ativados, sendo uma molécula determinante para o desenvolvimento da resposta Th2 (ZAMORANO; RIVAS, 2003). A escassez de IL-4 em válvulas cardíacas de pacientes com cardiopatia reumática foi associada com a gravidade da doença, o que indica a predominância da resposta Th1 no ambiente de lesão tecidual valvar (GUILHERME, LUIZA *et al.*, 2004). Em contrapartida, nossos dados demonstraram que ao contrário do tecido valvar, os níveis circulantes foram elevados nessa doença.

Na doença de Chagas, diversos estudos já relataram aumento de citocinas associadas com a resposta Th2. A maioria foram estudos comparativos entre a forma clínica cardíaca e indeterminada e em relação a indivíduos não infectados (BESTETTI *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2014). Além disso, a expressão de mRNA de IL-5, IL-10 e IL-13 foi aumentada em CMSPs de pacientes com doença de Chagas (DUTRA *et al.*, 1997). Em nossos resultados, os níveis plasmáticos de IL-5, IL-9 e IL-13 foram maiores apenas na cardiopatia chagásica comparado com as outras cardiopatias e o grupo controle (figura 6B, 6C, 6D). Esses dados sugerem, uma possível modulação de citocinas anti-inflamatórias em nível sistêmico, apesar da resposta ser predominantemente inflamatória na infecção crônica por *T. cruzi*.

A IL-9 é uma molécula produzida por células Th2 e mastócitos ativados (NOELLE; NOWARK, 2013). Os dados disponíveis na literatura, referentes à sua contribuição em doenças cardiovasculares são escassos. Além disso, não há

informações sobre o seu papel na doença de Chagas. Cappuzello et al. (2011) relataram níveis aumentados dessa molécula em pacientes com doença cardíaca isquêmica, associação que esteve relacionada com a disfunção ventricular esquerda e progressão da doença. Mais estudos serão necessários para o entendimento da função de IL-9 na doença de Chagas e em outras cardiopatias.

Os níveis elevados da citocina IL-13 na cardiopatia chagásica, pode ser um indicativo de seu envolvimento na função cardíaca desses indivíduos. A IL-13 pode contribuir para o processo fibrótico e remodelamento cardíaco por estimular a síntese de colágeno por fibroblastos e mediadores da matriz extracelular (BELLINI *et al.*, 2012; HELLER *et al.*, 2005). Nossos achados corroboram os dados de Alba-Alvarado *et al.* (2018) que demonstraram níveis aumentados de IL-13 no plasma de indivíduos com cardiopatia chagásica grave (DE ALBA-ALVARADO *et al.*, 2018).

A interação entre quimiocinas e seus receptores de superfície celular ocorre de forma relevante durante os estágios de doenças cardiovasculares. Algumas quimiocinas atuam nos estágios iniciais da doença, enquanto outras atuam na fase tardia e estão associadas com o desenvolvimento de arritmias e insuficiência cardíaca (DUSI *et al.*, 2016). Em nosso estudo, os dados da expressão plasmática de quimiocinas, evidenciaram um aumento na secreção de CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8 e CCL11 na doença de Chagas, demonstrando que essas moléculas são predominantes nesta cardiopatia em relação à cardiopatia reumática e idiopática (figura 8A, 8B, 9B,9C,9D,9E, respectivamente). Esses dados, sugerem a presença de mecanismos de recrutamento celular persistentes na patogênese da cardiopatia chagásica, que podem estar associados com o dano tecidual cardíaco nesses indivíduos.

A resposta inflamatória exacerbada é um dos principais fatores de gravidade da cardiopatia chagásica crônica. A miocardite é caracterizada pela presença abundante em células Th1, que culmina na hipertrofia dos cardiomiócitos e fibrose (HIGUCHI *et al.*, 1993). O recrutamento celular para os sítios de inflamação é mediado principalmente por quimiocinas, que se ligam em receptores expressos na superfície celular de leucócitos, e induzem a migração para os locais de lesão inflamatória (CUNHA-NETO *et al.*, 2009). A quimiocina CCL2 regula o recrutamento de monócitos e a diferenciação de macrófagos além de induzir a ativação de células T CD8<sup>+</sup>, que são as principais células presentes no infiltrado inflamatório da cardiopatia chagásica

(REIS et al., 1993). Talvani *et al.* (2004) relataram níveis aumentados de CCL2 no plasma de indivíduos chagásicos com cardiopatia grave, correlacionando-se positivamente com a gravidade da doença. Além disso, já foi descrita a elevação nos níveis plasmáticos das quimiocinas CCL3 e CCL4 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; TALVANI *et al.*, 2004).

Níveis aumentados da quimiocina CCL4 foi observado também na cardiopatia reumática (figura 9A). Essa quimocina está diretamente associada com o recrutamento preferencial de células CD4<sup>+</sup>, o que é consistente com as evidências de que linfócitos CD4<sup>+</sup>, é a principal subpopulação de células T encontrada no infiltrado inflamatório de pacientes com essa cardiopatia (TOOR; VOHRA, 2012). CCL3 e CCL4 participam principalmente no recrutamento de macrófagos e células NK, e se ligam ao receptor CCR5 em células alvo. Uma forte associação entre essas moléculas foi demonstrada em nosso trabalho, pela análise de dendograma (figura 14), fortalecendo a hipótese de que estejam envolvidas no processo de recrutamento celular na cardiopatia chagásica.

Adicionalmente, nossos dados demonstraram uma expressão aumentada de CCL5 e CXCL10 na cardiopatia chagásica (figura 9B e 9D), de forma consistente com outros trabalhos realizados (BATISTA *et al.*, 2018; LUZ *et al.*, 2013). Nossos dados, entretanto, demonstraram de forma inédita, que os níveis plasmáticos dessas moléculas são predominantes na cardiopatia chagásica em relação às cardiopatias avaliadas. A presença desses mediadores no plasma, pode refletir a natureza inflamatória que é encontrada no miocárdio desses pacientes com Chagas.

A expressão aumentada dos receptores CCR5 e seu ligante CCL5 já foi detectada no coração de pacientes com cardiopatia chagásica (NOGUEIRA *et al.*, 2012). Além disso, A expressão da molécula CCR5 já foi atribuída com a susceptibilidade ao desenvolvimento de cardiopatia chagásica (CALZADA *et al.*, 2001). Adicionalmente, a análise de associação por dendograma, revelou uma associação entre as quimiocinas CCL5 e CXCL10 (figura 14). Apesar de serem de grupos quimiotáticos diferentes, assim como apresentarem receptores distintos nas células alvo, essas moléculas compartilham funções semelhantes associadas com a resposta inflamatória Th1 (SOKOL; LUSTER, 2015). A expressão aumentada de CXCL10 foi observada na cardiopatia chagásica. Trata-se de uma proteína produzida em resposta ao IFN- $\gamma$ , que pode contribuir para a gravidade das cardiopatias

avaliadas, já que esta potencializa a resposta de perfil Th1 e, conseqüentemente, a resposta inflamatória (LIU *et al.*, 2011; LUSTER, 2004).

A CCL11 é secretada principalmente por eosinófilos, células que regulam a produção e migração de fibroblastos, síntese de colágeno, além de promover a quimiotaxia de mastócitos, células T e macrófagos (LAMKHIOUED *et al.*, 2003; MANGIERI *et al.*, 2012; PONATH *et al.*, 1996; PUXEDDU *et al.*, 2006). No presente estudo, foi demonstrado, que a liberação plasmática dessa molécula é aumentada no grupo de indivíduos com cardiopatia chagásica comparado ao grupo Controle (figura 9E). Nossos dados apontam para uma possível contribuição de CCL11, para o recrutamento celular e potencial fibrótico na cardiopatia chagásica, no entanto estudos mais detalhados sobre a função dessa molécula, serão importantes para esclarecer efeitos diretos na cardiopatia chagásica.

Nossos dados demonstraram ainda, aumento nos níveis de CXCL8 na cardiopatia chagásica, quando comparado com a cardiopatia idiopática e o grupo Controle (figura 9C). O papel dessa quimiocina na doença de Chagas, ainda é pouco compreendido. É possível que esteja associada principalmente com o recrutamento celular de neutrófilos. Estudos anteriores sugerem que níveis plasmáticos elevados de CXCL8, promovem a formação de remodelamento miocárdico e falha cardíaca em pacientes com infarto agudo do miocárdio (DOMINGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2006; ZARROUK-MAHJOUB *et al.*, 2016). Além disso, níveis séricos elevados já foram observados em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva quando comparado com indivíduos saudáveis. Mais estudos serão necessários para esclarecer a contribuição de CXCL8 na cardiopatia chagásica.

As quimiocinas da família CXC são produzidas por uma variedade de células, incluindo células T, fibroblastos, células musculares lisas e endoteliais, e além disso, há evidências de que a liberação dessas moléculas por monócitos ativados e plaquetas podem contribuir para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (GULLESTAD *et al.*, 2000).

Os nossos resultados demonstraram, que os níveis plasmáticos da maioria das quimiocinas avaliadas, estão aumentados na cardiopatia chagásica em comparação com as demais cardiopatias, indicando uma forte ativação imunológica por essas moléculas. Esses dados sugerem um possível potencial de recrutamento celular de

leucócitos ativados para o tecido cardíaco desses pacientes, o que pode contribuir diretamente para a patogênese e gravidade da doença, pela liberação de mediadores inflamatórios e citotóxicos que podem levar a lesão cardíaca. Em nosso estudo, não foi realizado, uma análise de correlação entre os níveis aumentados dessas moléculas e a função cardíaca dos pacientes incluídos no estudo, devido às limitações dos dados clínicos disponíveis desses indivíduos. Esses dados poderiam evidenciar informações mais detalhadas sobre a associação destes mediadores e a gravidade da doença.

A análise de PCA (figura 16) revelou que há uma similaridade entre os níveis dos mediadores solúveis avaliados entre o grupo controle e a cardiopatia idiopática, e uma maior dispersão no grupo com cardiopatia chagásica. Além disso, a análise por mapa de calor (heat map) evidenciou uma heterogeneidade no padrão de liberação dos mediadores solúveis avaliados entre os grupos de estudo. Esses dados podem ser explicados pela diferença no tamanho amostral entre os grupos avaliados, que foi uma limitação em nosso estudo. Adicionalmente, neste estudo, não foi realizada uma classificação clínica entre os indivíduos cardiopatas chagásicos ou com cardiopatia reumática. Essa variabilidade pode ocorrer devido a um perfil distinto de gravidade entre eles. Similarmente, as cardiopatias idiopáticas mostram grande heterogeneidade, possivelmente associada às causas variadas dessas cardiopatias.

As doenças crônicas envolvem eventos inflamatórios e alterações fenotípicas e funcionais de células imunes. Os linfócitos T são as principais células da resposta imune adaptativa presentes em doenças crônicas, e no contexto de cardiopatias, estão associadas com a inflamação, fibrose, hipertrofia e disfunção cardíaca (FRIELER, 2016). Estudos em modelos animais, demonstraram que a neutralização de células T, reduziu a quimiotaxia de mediadores inflamatórios, reduzindo a hipertrofia e fibrose miocárdica (HUBER.; FELDMAN; SARTINI, 2006; LAROUMANIE *et al.*, 2014). Nesse sentido, propusemo-nos em avaliar a frequência de diferentes subpopulações de células T em CMSPs de indivíduos com cardiopatia chagásica, idiopática e reumática.

Os nossos dados demonstraram aumento na frequência de células CD4<sup>+</sup> totais no grupo com cardiopatia reumática quando comparado com a cardiopatia idiopática e chagásica (figura 17). As células CD4<sup>+</sup> atuam orquestrando a resposta imune durante condições patológicas, pela liberação de mediadores solúveis, como citocinas e quimiocinas, pela interação com células B para produção de anticorpos e

ainda pelo recrutamento celular de basófilos, neutrófilos e macrófagos para sítios infecciosos e/ou inflamatórios (ZHU; PAUL, 2019). Estudos anteriores já relataram que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são os principais mediadores da resposta imune efetora na cardiopatia reumática, com frequência aumentada em sangue periférico desses indivíduos, assim como no infiltrado inflamatório de lesões valvares, envolvidos principalmente com a liberação de citocinas inflamatórias que contribuem para patogênese da doença (MORRIS . *et al.*, 1993; TOOR; VOHRA, 2012). É importante destacar que a subpopulação celular CD4<sup>+</sup> é fortemente associada com a miocardite autoimune, o que correlaciona-se diretamente com o aumento da frequência na cardiopatia reumática, que se desenvolve em resposta a reação cruzada entre antígenos da bactéria estreptocócica e autoantígenos presentes no coração (GUILHERME *et al.*, 2001).

A análise da subpopulação CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> demonstrou que não houve alterações na frequência entre os grupos estudados (figura 17). Para a subpopulação CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, os dados demonstraram uma tendência de aumento no grupo com cardiopatia reumática e chagásica em relação ao grupo com cardiopatia idiopática, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa (figura 17). CD28 é uma molécula de superfície, co-estimulatória de linfócitos T, que em células CD4<sup>+</sup>, está envolvida com a sensibilidade aos receptores de antígenos e com a sobrevivência celular, por induzir a expressão de moléculas anti-apoptóticas (ACUTO; MICHEL, 2003). A perda da expressão nessas células tem sido associada com a estimulação antigênica persistente, sendo atribuída com função citotóxica em condições inflamatórias (DUMITRIU *et al.*, 2012; HAACH *et al.*, 2013). Na síndrome coronariana aguda, células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> foram resistentes a apoptose, e em pacientes com fibrilação atrial, a frequência aumentada foi associada com um pior prognóstico clínico (KOVALCSIK *et al.*, 2015; SULZGRUBER *et al.*, 2017).

Ao avaliar os dados referentes a linfócitos T CD8<sup>+</sup>, nossos dados evidenciaram mais uma vez, aumento na frequência de células CD8<sup>+</sup> totais em sangue periférico de pacientes com cardiopatia reumática (figura 18A). Estudos anteriores já demonstraram aumento na frequência dessa subpopulação celular (TOOR; VOHRA, 2012). Além disso, a expressão reduzida da região Vβ2 em células CD8<sup>+</sup> de pacientes com cardiopatia reumática foi associada com um processo imune proeminente, por superantígenos estreptocócicos ou autoantígenos cardíacos (CARRION *et al.*, 2003).

Adicionalmente, houve redução na subpopulação CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e tendência de aumento em células CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (figura 18B e 18C). As células CD8<sup>+</sup> passam por uma redução progressiva na expressão da molécula CD28 conforme são submetidas a estímulo imune persistente (VALENZUELA; EFFROS, 2002). A subpopulação CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> é associada com a produção de citocinas inflamatórias como TNF e IFN- $\gamma$  e de moléculas citotóxicas como granzima e CD107a (HODGE, 2011). Diversos estudos indicam que a frequência dessa subpopulação aumenta em condições patológicas humanas como em infecções virais e doenças autoimunes (GIUBILATO *et al.*, 2011; GRANT, 2004; BANO *et al.*, 2019).

Não há dados na literatura sobre o papel de células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> na cardiopatia reumática e mais estudos serão necessários para avaliar a contribuição dessas subpopulações celulares, em relação a produção de citocinas e moléculas citotóxicas. Na doença de Chagas humana, trabalhos anteriores do nosso grupo já demonstraram que ocorre aumento na frequência dessas subpopulações em linfócitos periféricos estimulados com *T. cruzi*, quando comparado com indivíduos saudáveis, e de forma importante, estão associadas com a expressão diferencial de citocinas em diferentes formas clínicas da doença (DUTRA *et al.*, 1996; MENEZES *et al.*, 2004).

A subpopulação de células T duplo negativas também foi avaliada neste estudo. Trata-se de linfócitos T CD3<sup>+</sup> que não expressam os correceptores CD4 e CD8, mas podem ser subdivididas em células DN TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  (FISCHER *et al.*, 2005). Em sangue periférico e órgãos linfoides de indivíduos saudáveis, aproximadamente 1 a 5% das células T são duplo negativas (FAY *et al.*, 2016). No entanto, em infecções parasitárias e doenças autoimunes ocorre um aumento na frequência dessas células (ANTONELLI *et al.*, 2006; REINHARDT; MELMS, 2000). Nossos dados demonstraram um aumento na frequência de células DN TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, na cardiopatia reumática e idiopática (figura 19B). O conhecimento sobre a contribuição dessas células nessas cardiopatias ainda não é esclarecido. No entanto, sabe-se que essa subpopulação está associada com um perfil modulatório em infecções parasitárias, pela expressão da citocina IL-10 (GOLLOB *et al.*, 2008).

Na doença de Chagas, trabalhos do nosso grupo relataram um perfil regulatório por essa subpopulação celular, em sangue periférico de pacientes da forma clínica indeterminada, e um potencial inflamatório em pacientes chagásicos cardiopatas pela expressão de TNF e IFN- $\gamma$ , após exposição *in vitro* a tripomastigotas de *T. cruzi* e

componentes derivados dessas formas infectivas. (VILLANI *et al.*, 2010; PASSOS *et al.*, 2017). É importante relatar que o presente estudo foi realizado *ex vivo*, e, portanto, não foi utilizado nenhum estímulo para avaliar as diferentes subpopulações de células T. Aumento na frequência de células T convencionais, como linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> já foi descrita na cardiopatia reumática e idiopática, no entanto, não há estudos relatando o papel dessas células com expressão diferencial de CD28. Adicionalmente, não há dados disponíveis na literatura sobre a contribuição de células duplo negativas. Mais estudos serão necessários para compreender o papel dessas subpopulações celulares na cardiopatia reumática e idiopática. A avaliação da expressão de citocinas por essas células poderá elucidar mecanismos associados com a resposta imune protetora ou patogênica nessas cardiopatias.

## 8. CONCLUSÃO E COMENTÁRIOS FINAIS

Os nossos dados apontam para uma forte ativação imunológica na doença de Chagas pelos níveis plasmáticos elevados dos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas no plasma desses indivíduos, em relação a outras cardiopatias.

De forma importante, nosso estudo demonstrou que os fatores de crescimento estão presentes durante a infecção chagásica crônica, sugerindo a possível contribuição dessas moléculas, para a formação de fibrose tecidual que é regulada pela maioria dos fatores avaliados.

Os níveis elevados de citocinas são consistentes com trabalhos anteriores que demonstraram sua associação com a patogênese da doença de Chagas. Adicionalmente, nosso estudo revelou mais uma vez, que citocinas anti-inflamatórias também são moduladas na cardiopatia chagásica, ainda que o ambiente sistêmico e tecidual permaneça predominantemente pró-inflamatório.

O aumento nos níveis de quimiocinas já descritas em estudos anteriores (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10), bem como das novas moléculas identificadas neste estudo (CXCL8 e CCL11), sugere um papel relevante no recrutamento de leucócitos para o tecido inflamado, contribuindo para a gravidade da doença de Chagas.

Por outro lado, níveis plasmáticos elevados de algumas moléculas, foram comuns entre cardiopatias de diferentes etiologias. Esses dados foram evidenciados

pelos níveis plasmáticos elevados de PDGF-BB, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 e CCL4 na cardiopatia chagásica e reumática, e pela secreção plasmática elevada de IL-1Ra em todas as cardiopatias avaliadas neste estudo. É importante destacar, ainda, que os efeitos desses mediadores podem variar entre as cardiopatias, de forma dependente da etiologia. A citocina IL-17, por exemplo, tem sido associada a um efeito protetor na cardiopatia chagásica, enquanto, na cardiopatia reumática, sua expressão correlaciona-se com a gravidade da doença.

Os nossos dados sugerem, portanto, que há uma diferença nos níveis plasmáticos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento na cardiopatia chagásica em comparação a cardiopatias de outras etiologias. O estudo das diferentes subpopulações de células T revelou que células CD8<sup>+</sup> com expressão diferencial de CD28 podem estar envolvidas com a resposta imunológica na cardiopatia reumática. Além disso, nossos dados demonstraram pela primeira vez, a expansão de células duplo negativas com expressão do TCR $\gamma\delta$  na cardiopatia reumática e idiopática, o que desperta o interesse para novos estudos que possam esclarecer a contribuição dessas células nessas cardiopatias.

Nossos achados trazem novos conhecimentos sobre a resposta imunológica em diferentes cardiopatias e podem esclarecer mecanismos associados com a inflamação e progressão da doença. Além disso, nossos resultados indicam que a cardiopatia chagásica está associada a uma forte ativação imunológica, possivelmente associada com o pior desfecho clínico em relação às outras cardiopatias avaliadas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUTO, O.; MICHEL, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 12, p. 939-951, 2003.

ANDRADE, J.P et al. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 96, p. 434-442, 2011.

ANDRADE, D.V.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.

ANGELO, L. S.; KURZROCK, R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 10, p. 2825-2830, 2007.

ANTONELLI, L.R.V. et al. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>)  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 74, n. 11, p. 6317-6323, 2006.

BANO, A. et al. CD28 null CD4 T-cell expansions in autoimmune disease suggest a link with cytomegalovirus infection. **F1000Research**, v. 8, p. F1000 Faculty Rev-327, 2019.

BARBOSA, A. P. et al. Comparison of outcome between Chagas cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 97, p. 517-525, 2011.

BARTEKOVA, M. *et al.* Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. **Heart Failure Reviews**, v. 23, n. 5, p. 733–758, 2018.

BASU, A. et al. Cutting edge: vascular endothelial growth factor-mediated signaling in human CD45RO<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells promotes Akt and ERK activation and costimulates IFN- $\gamma$  production. **The journal of immunology**, v. 184, n. 2, p. 545-549, 2010.

BATISTA, A.M. et al. Genetic polymorphism at CCL5 is associated with protection in Chagas' heart disease: antagonistic participation of CCR1<sup>+</sup> and CCR5<sup>+</sup> cells in chronic chagasic cardiomyopathy. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 615, 2018.

BECHER, B.; TUGUES, S.; GRETER, M. GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation. **Immunity**, v. 45, n. 5, p. 963-973, 2016.

BELLINI, A. et al. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients. **Mucosal immunology**, v. 5, n. 2, p. 140-149, 2012.

BELLOTTI, G. *et al.* In vivo detection of Trypanosoma cruzi antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. **American Heart Journal**, v. 131, n. 2, p. 301–307, 1996.

BENVENUTI, L. A. *et al.* Chronic American trypanosomiasis: Parasite persistence in

endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 102, n. 6, p. 481–487, 2008.

BESTETTI, R. B.; MUCCILLO, G. Clinical course of chagas' heart disease: A comparison with dilated cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, v. 60, n. 2, p. 187–193, 1997.

BESTETTI, R.B. et al. Determination of the Th1, Th2, Th17, and Treg cytokine profile in patients with chronic Chagas heart disease and systemic arterial hypertension. **Heart and vessels**, v. 34, n. 1, p. 123-133, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00380-018-1228-z>>.

BILIK, M. Z. et al. Serum levels of IL-17 and IL-23 in patients with rheumatic mitral stenosis. **Medicine**, v. 95, n. 18, p. e3562, 2016.

BOCCHI, E. A. et al. The reality of heart failure in Latin America. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 11, p. 949–958, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2013.06.013>>.

BRODSKYN, C. I. et al. Cytotoxicity in patients with different clinical forms of Chagas' disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 105, n. 3, p. 450–455, 1996.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 5, p. 419–427, 2003.

CALZADA, J. E. et al. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. **Tissue Antigens**, v. 58, n. 3, p. 154–158, 2001.

CAMARA, E. J. N. et al. Elevated IL-17 levels and echocardiographic signs of preserved myocardial function in benznidazole-treated individuals with chronic Chagas' disease. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 79, p. 123–130, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.369>>.

CAPPUZZELLO, C. et al. Increase of plasma IL-9 and decrease of plasma IL-5, IL-7, and IFN- $\gamma$  in patients with chronic heart failure. **Journal of translational medicine**, v. 9, n. 1, p. 28, 2011.

CARAPETIS, J. R. et al. Acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Nature reviews disease primers**, v. 2, n. January, p. 15084, 2016.

CARRIÓN, F. et al. Selective depletion of V $\beta$ 2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood from rheumatic heart disease patients. **Journal of autoimmunity**, v. 20, n. 2, p. 183-190, 2003.

CASTILLO-RIQUELME, M. Chagas disease in non-endemic countries. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 4, p. e379–e380, 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30090-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30090-6)>.

CHEN, Zhu et al. Th2 and eosinophil responses suppress inflammatory arthritis. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 11596, 2016.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204, 2017.

COSTA, G.C. et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 3, p. 451-454, 2009.

CUNHA-NETO, E. et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 133–137, 1998

CUNHA-NETO, E. et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. **The American journal of pathology**, v. 167, n. 2, p. 305-313, 2005.

CUNHA-NETO, E. et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 252-258, 2009.

DE NOYA, B. A. et al. Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. **Parasite epidemiology and control**, v. 1, n. 2, p. 188-198, 2016.

D'IMPERIO LIMA, M. R. . et al. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. **Journal of Immunology**, v. 137, p. 353–356, 1886.

DE ALBA-ALVARADO, M. et al. Th-17 cytokines are associated with severity of *Trypanosoma cruzi* chronic infection in pediatric patients from endemic areas of Mexico. **Acta tropica**, v. 178, p. 134-141, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.009>>.

DE LEEUW, N. et al. Histopathologic findings in explanted heart tissue from patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. **Transplant International**, v. 14, n. 5, p. 299–306, 2001.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. Plasma concentrations of CCL3 and CCL4 in the cardiac and digestive clinical forms of chronic Chagas disease. **Cytokine**, v. 91, p. 51–56, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.12.002>>.

DENNERT, R.; CRIJNS, H. J.; HEYMANS, S. Acute viral myocarditis. **European Heart Journal**, v. 29, n. 17, p. 2073–2082, 2008.

DIAS, J. C. P. Cecílio Romaña, o sinal de Romaña e a doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 407–413, out. 1997. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86821997000500012&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86821997000500012&lng=pt&tlng=pt)>.

DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual review of immunology**, v. 27, n. 1, p. 519-550, 2009.

DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A. *et al.* Prognostic value of interleukin-8 as a predictor of heart failure in patients with myocardial infarction and percutaneous intervention. **International Journal of Cardiology**, v. 111, n. 1, p. 158–160, 2006.

DUMITRIU, I.E. *et al.* High levels of costimulatory receptors OX40 and 4-1BB characterize CD4<sup>+</sup> CD28null T cells in patients with acute coronary syndrome. **Circulation research**, v. 110, n. 6, p. 857-869, 2012.

DUSI, V. *et al.* Chemokines and heart disease: a network connecting cardiovascular biology to immune and autonomic nervous systems. **Mediators of inflammation**, v. 2016, n. 1, p. 5902947, 2016.

DUTRA, W. O. *et al.* Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. **International immunology**, v. 6, n. 4, p. 499-506, 1994.

DUTRA, W. O. *et al.* Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. **Scand J Immunol**, v. 43, n. 1, p. 88–93, 1996.

DUTRA, W. O. *et al.* Cytokine mRNA Profile of Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated from Individuals with *Trypanosoma cruzi* Chronic Infection. **Scand. J. Immunol**, v. 45, p. 74–80, 1997.

DUTRA, W.O. *et al.* Self and Nonself Stimulatory Molecules Induce Preferential Expansion of CD5<sup>+</sup> B Cells or Activated T Cells of Chagasic Patients, Respectively. **Scand. J. Immunol**, v. 51, p. 91–97, 2000.

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

DUNICAN, E.M.; FAHY, J.V. The role of type 2 inflammation in the pathogenesis of asthma exacerbations. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, n. Supplement 2, p. S144-S149, 2015.

EL-DEMELLAWY, M. *et al.* Preferential recognition of human myocardial antigens by T lymphocytes from rheumatic heart disease patients. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 6, p. 2197–2205, 1997.

FAÉ, K. C. *et al.* CXCL9/mig mediates T cells recruitment to valvular tissue lesions of chronic rheumatic heart disease patients. **Inflammation**, v. 36, n. 4, p. 800–811, 2013.

FAE, K. C. *et al.* Mimicry in Recognition of Cardiac Myosin Peptides by Heart-Intralesional T Cell Clones from Rheumatic Heart Disease. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 9, p. 5662–5670, 2014.

FANOLA, C. L. *et al.* Interleukin-6 and the risk of adverse outcomes in patients after an acute coronary syndrome: Observations from the SOLID-TIMI 52 (stabilization of plaque using darapladib-thrombolysis in myocardial infarction 52) trial. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 10, 2017.

FAY, N.S.; LARSON, E. C.; JAMESON, J.M. Chronic inflammation and  $\gamma\delta$  T cells.

**Frontiers in immunology**, v. 7, p. 210, 2016.

FISCHER, B. E. et al. Interleukin-1 Receptor Antagonist Circulates in Experimental Inflammation and in Human Disease. **Blood**, v. 79, n. 9, p. 2196–2200, 1992.

FISCHER, K. et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR $\alpha\beta$ + CD4-CD8-double-negative regulatory T cells. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2828-2835, 2005.

FONSECA, S. G. et al. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic chagas disease cardiomyopathy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 362–371, 2007.

FRIELER, R. A.; MORTENSEN, R.M. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. **Circulation**, v. 131, n. 11, p. 1019-1030, 2015.

GALLINI, R. et al. PDGF-A and PDGF-B induces cardiac fibrosis in transgenic mice. **Experimental Cell Research**, v. 349, n. 2, p. 282–290, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.10.022>>.

GAZZINELLI, R. T. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 89–104, 1998.

GIUBILATO, S. et al. Expansion of CD4+ CD28null T-lymphocytes in diabetic patients: exploring new pathogenetic mechanisms of increased cardiovascular risk in diabetes mellitus. **European heart journal**, v. 32, n. 10, p. 1214-1226, 2011.

GOLLOB, K.J. et al. Immunoregulatory mechanisms and CD4– CD8–(double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1338-1343, 2008.

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

GRANT, M. Lack of CD28 expression on HIV-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with disease progression. **Immunology and Cell Biology**, p. 38–46, 2004.

GUILHERME, L. et al. Rheumatic Heart Disease Proinflammatory Cytokines Play a Role in the Progression and. **Cytokine**, v. 165, n. 5, p. 1583–1591, 2004.

GUILHERME, L. et al. T-cell reactivity against streptococcal antigens in the periphery mirrors reactivity of heart-infiltrating T lymphocytes in rheumatic heart disease patients. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5345–5351, 2001.

GULLESTAD, L. et al. CXC-chemokines , a new group of cytokines in congestive heart failure — possible role of platelets and monocytes. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 428–436, 2000.

GULLESTAD, L. et al. Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers. **Cardiology**, v. 122, n. 1, p. 23-35, 2012.

HAACH, F. et al. Characterization of CD4 + CD28 null T cells in patients with coronary artery disease and individuals with risk factors for atherosclerosis. **Cellular Immunology**, v. 281, p. 11–19, 2013.

HAMILTON, J. A.; ANDERSON, G. P. GM-CSF Biology. **Growth Factors**, v. 22, n. December, p. 225–231, 2004.

HAZEBROEK, M.; DENNERT, R.; HEYMANS, S. Idiopathic dilated cardiomyopathy: possible triggers and treatment strategies. **Netherlands Heart Journal**, v. 20, n. 7–8, p. 332–335, 2012.

HELLER, F. et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 550-564, 2005.

HENNING, R.J. Therapeutic angiogenesis: angiogenic growth factors for ischemic heart disease. **Future cardiology**, v. 12, n. 5, p. 585-599, 2016.

HIGUCHI, M. DE L. et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: Comparison with myocardial rejection process. **Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 423, n. 3, p. 157–160, 1993.

HODGE, G. et al. Role of increased CD8/CD28null T cells and alternative co-stimulatory molecules in chronic obstructive pulmonary disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 166, n. 1, p. 94-102, 2011.

HUBER, K. C. et al. T-lymphocyte subsets in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **International Journal of Cardiology**, v. 22, n. 1, p. 59–66, 1989.

HUBER, S. A.; FELDMAN, A.M.; SARTINI, D. Coxsackievirus B3 induces T regulatory cells, which inhibit cardiomyopathy in tumor necrosis factor- $\alpha$  transgenic mice. **Circulation research**, v. 99, n. 10, p. 1109-1116, 2006.

HOUSE, S. L. et al. Fibroblast growth factor 2 mediates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through activation of the extracellular regulated kinase. **Molecular and cellular pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 143, 2010.

KARDAMI, E. et al. Fibroblast growth factor-2 and cardioprotection. **Heart Fail Rev**, v. 12, p. 267–277, 2007.

KAWAKAMI, M. et al. Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. **Blood**, v.76, p.1962-4,1990.

KEMP, C.D.; CONTE, J.V. The pathophysiology of heart failure. **Cardiovascular pathology**, v. 21, n. 5, p. 365-371, 2012.

KLINKHAMMER, B.M.; FLOEGE, J.; BOOR, P. PDGF in organ fibrosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 62, p. 44-62, 2018.

KOVALCSIK, E. et al. Proteasome-mediated reduction in proapoptotic molecule Bim renders CD4<sup>+</sup> CD28<sup>null</sup> T cells resistant to apoptosis in acute coronary syndrome. **Circulation**, v. 131, n. 8, p. 709-720, 2015.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **Journal of Immunology**, v. 128, p. 2009–2012, 1982.

KUMAR, S.; MAULIK, S. Role of Cytokines in Heart Failure Journal of Pharmacological Reports. **Journal of Pharmacological Reports**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2017.

KUWABARA, T. et al. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–11, 2017.

LAAN, M. et al. A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF- $\alpha$ . **European Respiratory Journal**, v. 21, n. 3, p. 387-393, 2003.

LAMKHIOUED, B. et al. The CCR3 Receptor Is Involved in Eosinophil Differentiation and Is Up-Regulated by Th2 Cytokines in CD34<sup>+</sup> Progenitor Cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 537–547, 2003.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009.

LAROUMANIE, F. et al. CD4<sup>+</sup> T Cells Promote the Transition From Hypertrophy to Heart Failure During Chronic Pressure Overload. **Circulation**, v. 129, p. 2111–2124, 2014.

LEÃO, S. C. et al. IL-10 and ET-1 as biomarkers of rheumatic valve disease. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 29, n. 1, p. 25–30, 2014.

LIU, M. et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 3, p. 121–130, 2011.

LONGHI, S. A. et al. Cytokine Production but Lack of Proliferation in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Chronic Chagas ' Disease Cardiomyopathy Patients in Response to *T. cruzi* Ribosomal P Proteins. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, 2014.

LUSTER, A. D. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). **Journal of Experimental Medicine**, v. 166, n. 4, p. 1084–1097, 2004.

LUZ, P. R. et al. Association of IP-10 and PDGF-BB levels with clinical forms of chronic Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, v. 169, n. 4, p. e53–e55, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.08.110>>.

MACAMBIRA, S. G. et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 11, p. 3843–3850, 2009.

MACDONALD, K. P. A. et al. Donor pretreatment with progenipoiectin-1 is superior to granulocyte colony-stimulating factor in preventing graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. **Blood**, v. 101, n. 5, p. 2033–2042, 2003.

MACÊDO, V. Indeterminate Form of Chagas Disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 311–316, 1999.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1–17, 2015.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n. 4, p. 661–665, 2013.

MANGIERI, D. et al. Eotaxin/CCL11 in idiopathic retroperitoneal fibrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 10, p. 3875–3884, 2012.

MANN, D.L. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. **Circulation research**, v. 91, n. 11, p. 988-998, 2002.

MARON, B. J. et al. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies. **Circulation**, v. 113, n. 14, p. 1807–1816, 2006. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287>>.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 167–174, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.10.002>>.

MARUTA, M. et al. Humoral immunity and lymphocyte subsets in patients with dilated cardiomyopathy. *Rinsho byori*. **The Japanese journal of clinical pathology**, v. 39, n. 8, p. 824–828, 1991.

MAYA, J. D. et al. Chronic Chagas cardiomyopathy: a therapeutic challenge and future strategies. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 1, n. 6, p. 579–584, 2017.

MEDAMANA, J; CLARK, R.A.; BUTLER, J. Platelet-derived growth factor in heart failure. **Heart Failure**, p. 355-369, 2016.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.

MENEZES, C. et al. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: Distinct repertoire and cytokine expression. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 137, n. 1, p. 129–138, 2004.

MENEZES, C. et al. Clinical aspects of Chagas disease and implications for novel therapies. **Drug development research**, v. 72, n. 6, p. 471-479, 2011.

MINOPRIO, P. M. et al. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 24, p. 669–679, 1986.

MOBINI, R.; ANDERSSON, B. The therapeutic potential of immune therapy in idiopathic dilated cardiomyopathy. **Future Cardiology**, v. 1, n. 5, p. 675–682, 2005.

MOR, F.; QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. Angiogenesis-Inflammation Cross-Talk: Vascular Endothelial Growth Factor Is Secreted by Activated T Cells and Induces Th1 Polarization. **The Journal of Immunology Angiogenesis-Inflammation**, v. 172, p. 4618–4623, 2014.

MORRIS, K. et al. Increase in Activated T Cells and Reduction in Suppressor / Cytotoxic T Cells in Acute Rheumatic Fever and Active Rheumatic Heart Disease: A Longitudinal Study. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 979–983, 1993.

MORRIS, S.C.; GAUSE, W. C.; FINKELMAN, F.D. IL-4 suppression of in vivo T cell activation and antibody production. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 1734–1740, 2000.

MOSER, B. et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends in immunology**, v. 25, n. 2, p. 75–84, 2004.

MCDERMOTT, A. J. et al. Role of GM-CSF in the inflammatory cytokine network that regulates neutrophil influx into the colonic mucosa during *Clostridium difficile* infection in mice. **Gut microbes**, v. 5, n. 4, p. 10–9, 2014.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Circulating level of regulatory T cells in rheumatic heart disease: an observational study. **Indian Heart Journal**, v. 68, n. 3, p. 342–348, 2016.

NOGUEIRA, L. G. *et al.* Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, 2012.

NOELLE, R.J.; NOWAK, E. C. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 10, p. 683–687, 2010.

NUNES, M.C. P. et al. Morphofunctional characteristics of the right ventricle in Chagas' dilated cardiomyopathy. **International journal of cardiology**, v. 94, n. 1, p. 79–85, 2004.

NUNES, M.C.P. et al. Chagas cardiomyopathy: an update of current clinical knowledge and management: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 138, n. 12, p. e169–e209, 2018.

NUNES, M.C.P. et al. Predictors of Mortality in Patients With Dilated Cardiomyopathy: Relevance of Chagas Disease as an Etiological Factor. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 63, n. 7, p. 788–797, 2010. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1885-5857\(10\)70163-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1885-5857(10)70163-8)>.

OKAMOTO, E. E. et al. Biomarkers in *Trypanosoma cruzi*-Infected and Uninfected Individuals with Varying Severity of Cardiomyopathy in Santa Cruz, Bolivia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. The fibroblast growth factor signaling pathway. **Wiley**

**Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 4, n. 3, p. 215-266, 2015.

PINTO DIAS, J.C. Human chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. **Journal of tropical medicine**, v. 2013, n. 1, p. 789758, 2013.

PATTI, G. et al. Early interleukin-1 receptor antagonist elevation in patients with acute myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 43, n. 1, p. 35-38, 2004.

PATTI, G. et al. Interleukin-1 receptor antagonist levels correlate with extent of myocardial loss in patients with acute myocardial infarction. **Clinical Cardiology**, v. 28, n. 4, p. 193–196, 2005.

PASSOS, L. S. A. et al. Blocking of CD1d Decreases Trypanosoma cruzi-Induced Activation of CD4-CD8- T Cells and Modulates the Inflammatory Response in Patients with Chagas Heart Disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 6, p. 935–944, 2016.

PASSOS, L. S. A. et al. Specific activation of CD4–CD8– double-negative T cells by Trypanosoma cruzi-derived glycolipids induces a proinflammatory profile associated with cardiomyopathy in Chagas patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 190, n. 1, p. 122–132, 2017.

PÉREZ-MOLINA, J.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PÉREZ-ANTÓN, E. *et al.* Impact of benznidazole treatment on the functional response of Trypanosoma cruzi antigen-specific CD4+CD8+T cells in chronic Chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. 1–22, 2018.

PONATH, P. D. *et al.* Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin: Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 3, p. 604–612, 1996.

PUXEDDU, I. *et al.* The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 1, p. 103–110, 2006.

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

REINHARDT, C; MELMS, A. Normalization of elevated CD4–/CD8–(double-negative) T cells after thymectomy parallels clinical remission in myasthenia gravis associated with thymic hyperplasia but not thymoma. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 48, n. 4, p. 603-608, 2000.

REIS, DD'Avila et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **The American journal of tropical medicine and**

hygiene, v. 48, n. 5, p. 637-644, 1993

REIS, M.M. et al. Fatores de crescimento presentes no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 509-518, 2000.

RIBEIRO, A. L. P. *et al.* Brain natriuretic peptide based strategy to detect left ventricular dysfunction in Chagas disease: A comparison with the conventional approach. **International Journal of Cardiology**, v. 109, n. 1, p. 34–40, 2006.

RIDIANDRIES, A.; TAN, J. T. M.; BURSILL, C. A. The role of chemokines in wound healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, 2018.

ROBERTS, S. et al. Pathogenic mechanisms in rheumatic carditis: focus on valvular endotheliuzanne um. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 3, p. 507-511, 2001.

SATHLER-AVELAR, R. *et al.* Phenotypic Features of Peripheral Blood Leucocytes During Early Stages of Human Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 58, p. 655–663, 2003.

SHACHAR, I.; KARIN, N. The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 1, p. 51–61, 2013.

SHIOMI, A.; USUI, T. Pivotal Roles of GM-CSF in Autoimmunity and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

SILVA, D. N. *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor-overexpressing mesenchymal stem cells exhibit enhanced immunomodulatory actions through the recruitment of suppressor cells in experimental chagas disease cardiomyopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–12, 2018.

SILVA, João Santana da et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 175, n. 1, p. 169-174, 1992.

SILVA, J. S. *et al.* The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 111–115, 1998.

SIMÕES, M. V. *et al.* Chagas Disease Cardiomyopathy. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 2, p. 173–189, 2018.

SOKOL, C. L.; LUSTER, A.D. The chemokine system in innate immunity. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 5, p. a016303, 2015.

SOSA-ESTANI, S.; VIOTTI, R.; SEGURA, E. L. Therapy , diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease : insight gained in Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. March, p. 167–180, 2009.

SOUSA, G. R. *et al.* Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity

in chagas disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–9, 2014.

SOUZA, P. E. A. *et al.* Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5283–5291, 2004.

STAHL, P. *et al.* Trypanosoma cruzi evades the protective role of interferon-gamma-signaling in parasite-infected cells. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110512, 2014.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 139-144, 2015.

SULZGRUBER, P. *et al.* The impact of CD4+ CD28null T-lymphocytes on atrial fibrillation and mortality in patients with chronic heart failure. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 117, n. 02, p. 349-356, 2017.

TAIMEH, Z. *et al.* Vascular endothelial growth factor in heart failure. **Nature reviews cardiology**, v. 10, n. 9, p. 519-530, 2013.

TOWBIN, J. A. Inherited cardiomyopathies. **Circulation Journal**, v. 78, n. 10, p. 2347-2356, 2014.

TALVANI, A. *et al.* Chemokine Receptor Expression on the Surface of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Chagas Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p. 0–6, 2004.

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

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 1, p. 54–74, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.001>>.

TOOR, D; VOHRA, H. Immune responsiveness during disease progression from acute rheumatic fever to chronic rheumatic heart disease. **Microbes and infection**, v. 14, n. 12, p. 1111-1117, 2012.

TURNER, M. D. *et al.* Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014.

UENO, A. *et al.* Increases in circulating T lymphocytes expressing HLA-DR and CD40 ligand in patients with dilated cardiomyopathy. **Heart and Vessels**, v. 22, n. 5, p. 316–321, 2007.

UNE, C. *et al.* Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell-derived interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) display different kinetics during experimental infection with Trypanosoma cruzi. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 121, n. 3, p. 499-505, 2000.

VILLANI, F.N.A. *et al.* Trypanosoma cruzi-Induced Activation of Functionally Distinct

$\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T Cells in Individuals with Polar Forms of Chagas' Disease. **Infection and immunity**, v. 78, n. 10, p. 4421-4430, 2010.

VALENZUELA, H. F.; EFFROS, R. B. Divergent Telomerase and CD28 Expression Patterns in Human CD4 and CD8 T Cells Following Repeated Encounters with the Same Antigenic Stimulus. **Clinical Immunology**, v. 105, n. 2, p. 117–125, 2002.

VIOTTI, R. et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 635-639, 2014.

VIRAG, J. A. I. *et al.* Fibroblast Growth Factor-2 Regulates Myocardial Infarct Repair. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 5, p. 1431–1440, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.070003>>.

VITELLI-AVELAR, D. M. *et al.* Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, n. 5, p. 516–525, 2008.

WAHL, S. M.; WONG, H.; MCCARTNEY-FRANCIS, N. Role of growth factors in inflammation and repair. **Journal of cellular biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 193-199, 1989.

WALKER, M. J. et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A Streptococcus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 264–301, 2014.

WARD, L.S. et al. Citocinas séricas na forma crônica da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 285-289, 1999.

WEN, Y. et al. Changes in the expression of Th17 cell-associated cytokines in the development of rheumatic heart disease. **Cardiovascular Pathology**, v. 24, n. 6, p. 382–387, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 975, p. v–xii, 1-100, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease>. Acesso em: 02 jun. 2019.

WORLD HEART FEDERATION. Rheumatic heart disease: a preventable, treatable form of cardiovascular disease. Disponível em: <https://www.world-heart-federation.org/programmes/rheumatic-heart-disease/>. Acesso em: 7 jun. 2019.

ZAMORANO, J.; RIVAS, M. D.; PEREZ, G. M. Interleukin-4: A multifunctional cytokine. **Immunologia**, v. 22, n. 2, p. 215-224, 2003.

ZARROUK-MAHJOUR, S. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokines in post-infarction left ventricular remodeling. **International Journal of Cardiology**, v. 221, p. 632–636, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.07.073>>.

ZHANG, Jun-Ming; AN, Jianxiong. Cytokines, inflammation, and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Immunobiology**, v. 112, n. 5, p. 1557–1570, 2019.

ZLOTNIK, A; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121-127, 2000.