

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular
Departamento de Morfologia

Cinética celular de neutrófilos e subpopulações de monócitos em
pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas
após estímulo com antígenos do *Trypanosoma cruzi*

João Paulo Bambirra Duarte

Belo Horizonte
Julho 2019

- 043 Duarte, João Paulo Bambirra.
Cinética de neutrófilos e subpopulações de monócitos em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de chagas após estímulo com antígenos do *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / João Paulo Bambirra Duarte. – 2019.
- 63 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau. Co-Orientadora: Dr^a.Nayara Ingrid de Medeiros.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.
1. Biologia Celular. 2. Cinética. 3. Doença de Chagas. 4. Imunidade inata. 5. *Trypanosoma cruzi*. I. Estanislau, Juliana de Assis Silva Gomes. II. Medeiros, Nayara Ingrid de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV.Título.

CDU: 576

João Paulo Bambirra Duarte

Cinética celular da imunidade inata em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas após estímulo com antígenos do *Trypanosoma cruzi*

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 final para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana de Assis Silva
Gomes Estanislau

Co-orientadora: Dr^ª. Nayara Ingrid de Medeiros

Belo Horizonte

Julho 2019

COLABORADORES

Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Morfologia

Profª. Drª. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Profª. Drª. Walderez Ornelas Dutra

Drª. Nayara Ingrid de Medeiros

Me. Bruna Fernandes Pinto

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira

RECURSOS FÍSICOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia das Interações Celulares – LABIC, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular – LICM, do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG.

RECURSOS FINANCEIROS

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ-04129-10, PPM-00501-13).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (403592/2008-9, 474796/2012-4, PQ 308219/2012-0, 404151/2012-4).

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - PAPES (407692/2012-6).



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
JOÃO PAULO BAMBIRRA DUARTE**

2019/2019
entrada
2/2017
2017719993

As nove horas do dia 16 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: "CINÉTICA CELULAR DA IMUNIDADE INATA EM PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS APÓS ESTÍMULO COM ANTÍGENOS DO *Trypanosoma cruzi*", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Aberto a sessão, a Presidente da Comissão, **Dr. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau	UFMG	Aprovado
Dra. Nayara Ingrid de Mendeiros	UFMG	Aprovado
Dra. Karine Silvestre	UNA	Aprovado
Dra. Marina Luiza Rodrigues Alves	FIOCRUZ/MG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado Aprovado.
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 16 de julho de 2019.**

Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (Orientadora) _____

Dra. Nayara Ingrid de Mendeiros (Coorientadora) _____

Dra. Karine Silvestre Karine Silvestre _____

Dra. Marina Luiza Rodrigues Alves Marina L. R. Alves Melo _____

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

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

Erika Cristina Jorge

“As nuvens mudam sempre de posição, mas sãmpre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos

Paulo Beleki

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Juliana não tenho palavras para expressar tudo o que representou na construção desse trabalho. Muito obrigado por todo respaldo científico, pessoal e na demorada tarefa de me orientar, me agregando quase como membro da sua família e pelo nosso convívio harmonioso durante esse tempo. Tudo o que for escrito aqui é pequeno perto da imensa gratidão e respeito que tenho e terei por você. Grato eu sou pelas oportunidades. Você é uma pessoa admirável e suas histórias sempre me inspiraram e vão continuar inspirando pelos caminhos que eu percorrer.

A minha co-orientadora Nayara Medeiros, que me recebeu e aceitou o longo desafio desse trabalho, contribuindo de forma tão ativa na minha caminhada. Mesmo com tanto cansaço, devido a todas atribuições, sempre tentou tirar o máximo de mim. Meu muito obrigado pelas oportunidades, por sempre acreditar na minha capacidade, pelo convívio e ensinamentos, não só sobre Chagas. Gratidão!

A minha amiga de todas as horas Mayara Belchior, que sempre esteve de coração aberto para me ouvir. Você foi uma das “recompensas” dessa etapa. Gratidão a todas as vezes que dividi minhas aflições do mestrado e da vida. Obrigado por deixar esse momento mais leve. Te amo!

As queridas Tereza Cal e Bruna Fernandes. A Tereza agradeço pela sua assertividade e sinceridade ao longo dessa caminhada. Saiba que sempre ponderei seus conselhos e broncas. A Bruna que, mesmo sempre atarefada, nos meus momentos de dúvidas, sempre vinha com um sorriso no rosto e dividia seu conhecimento sobre Chagas e imunologia.

Aos demais membros do “*Juju gatinha's Team*”, Rafael Silva, Rafael Mattos, Bruna Roque, Edson.

A Carol Koh que pessoa maravilhosa você é! Grato pelas longas conversas nas mesinhas do museu ou nos almoços, por sempre ter uma outra visão da questão e aconselhar, dando dicas, para que os problemas fluíssem da melhor forma. Você é uma fada!

A Eula Graciele um grande “achado” que se tornou uma amiga. Sua paciência, delicadeza e força foram fontes de grandes ensinamentos. As aulas e seminários foram uma gincana com você.

A sagitariana Isabela Nóbrega obrigado pela convivência, pela companhia e por deixar as aulas da PPGBIOCEL mais divertidas e pelas dicas com o mac.

Aos demais membros do LABIC Luiz, Nayagara, Janaina, Otoni, Victoria, Jaque, Vinicius, Hellen, Analice, Cecilia, Ana Carolina, Diana, Cecilia, Lucilene e Patrícia meus agradecimentos pelo convívio agradável durante essa etapa.

A “miga” Maria Heliza Araújo, um dos meus pontos de apoio nessa jornada, agradeço pela caminhada nos bastidores, pelas risadas sem motivos (ou com), pelos copos de sucos com pizza, pelas vezes que me fez sair de casa e por me fazer mudar o foco quando estava envolvido demais com artigos, *word* e *power point*. Obrigado por me ouvir por horas enquanto limpávamos o lab. Sua amizade foi de grande valia para mim durante todo esse tempo.

Ao biomédico Sandro Henrique por sempre me fazer rir, quando minha vontade era de chorar e largar tudo; E por me fazer pensar que posso tudo o que eu quiser. Sua amizade chegou no momento certo.

A Paula Fernanda agradeço por sua amizade, por todos os “puxões” de orelha e pelo seu alto astral. Por muitas vezes assumiu minhas dores e alegrias nessa caminhada. Ter contato com você durante esse tempo foi algo revigorante. Você é luz!!

A Gabriela Maíra, obrigado pelo apoio desde da graduação e por me ensinar a estudar. Uma amizade que foi além da sala de aula e esta perdurando pelos anos.

Aos meus queridos da Santa Clara Carol, Rayara, Dona Raí, Muller, Sinara, Carmem, “19”, “20”, “21”, “22”, “23” e “24” obrigado pelas oportunidades dadas no lado “B”, sempre acreditando no meu potencial como profissional, e pelos momentos de descontração, que por várias vezes me fizeram esquecer os problemas.

Aos pais, Lucília e Paulo, que sempre fizeram o possível para que meus sonhos pudessem ser realizados, e que acreditam em mim mais do que eu. Por todo respaldo emocional tão necessário quando se inicia a vida acadêmica e por terem orgulho do que faço. Principalmente, por aceitarem minhas escolhas.

Obrigado família! Minha Tias, Jane e Laura, que vibram comigo a cada pequena conquista e sonharam essa dissertação comigo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Evolução clínica da doença de Chagas.....	14
1.2 Resposta imune na doença de Chagas.....	15
1.3 Interação parasito-hospedeiro	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 POPULAÇÃO DE ESTUDO E MÉTODOS	25
3.1 Aspectos éticos	25
3.2 População de estudo.....	25
3.3 Critérios de inclusão	26
3.4 Critérios de exclusão.....	26
3.5 Desenho experimental.....	27
3.6 Preparação dos antígenos derivados da forma tripomastigota do <i>T. cruzi</i> (TRYPO) ...	28
3.7 Amostras	28
3.8 Culturas do sangue total.....	28
3.9 Aquisição em citometria de fluxo.....	29
3.10 Aquisição e estratégia de análise dos dados.....	30
3.11 Análise Estatística	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Análise da frequência de neutrófilos e subpopulações de monócitos	33
4.2 Análise da expressão de receptores de reconhecimento	34
4.3 Análise da expressão de moléculas de ativação	37
4.4 Análise da expressão de citocinas	40
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO.....	49
7 ANEXOS	50
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial da doença de Chagas.....	12
Figura 2: Representação esquemática do ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 3: Cascatas de sinalização dos receptores da imunidade inata	17
Figura 4: Processo de invasão celular e diferenciação do <i>T. cruzi</i>	23
Figura 5: Desenho experimental	29
Figura 6: Estratégias de análises das populações celulares.....	30
Figura 7: Análise da frequência de neutrófilos e subpopulações de monócitos	35
Figura 8: Análise da expressão do receptor <i>Toll 2</i>	36
Figura 9: Análise expressão do receptor <i>Toll 4</i>	37
Figura 10: Análise da expressão do receptor <i>Toll 9</i>	38
Figura 11: Análise da expressão da molécula de reconhecimento HLA-DR	39
Figura 12: Análise da expressão da molécula co-estimulatória CD80	40
Figura 13: Análise da expressão da molécula co-estimulatória CD86.	41
Figura 14: Análise da expressão da citocina IL-8.....	42
Figura 15: Análise da expressão da citocina IL-10.....	43
Figura 16: Análise da expressão da citocina IL-12.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – Aloficocianina
- BSA – Albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
- CARD – Forma clínica cardíaca
- CCC – Cardiomiopatia chagásica crônica
- CD – Grupo de diferenciação (Cluster of Differentiation)
- CDG – Forma clínica cardiodigestiva
- CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou
- DIG – Forma clínica digestiva
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ECG – Eletrocardiograma
- EDTA – Etilenodiaminotetracético
- ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- FL – Fluorescência
- FSC – Tamanho celular (Forward Scatter)
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HAS – Hipertensão arterial sistêmica
- HLA-DR – Antígeno de leucócito humano (Human Leukocyte Antigen)
- IFN- γ – Interferon gamma
- IL – Interleucina
- IND – Forma clínica indeterminada
- iNOS – Síntese de óxido nítrico induzida (Inducible Nitric Oxide Synthase)
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MFF – Solução fixadora (Macs Facs Fix)
- MHC-II – Complexo de histocompatibilidade de classe II
- MIF – Intensidade média de fluorescência (Mean Fluorescence Intensity)
- mmHg – Milímetro de mercúrio
- NI – Não Infectados
- NK – Células Natural Killer

NO – Óxido nítrico
PAMPs – Padrões moleculares associados ao patógeno
PBS – Tampão fosfato salínico
PBS-P – PBS-W a 0,5% de saponina
PBS-W – PBS a 0,5% de albumina sérica bovina
PE – Ficoeritrina
PE-Cy7 – Ficoeritrina cianina 5.1
PerCP – Proteína piridina de clorofila (Peridinin Chlorophyll Protein)
RPMI – Rosweel Park Memorial Institute
SSC – Granulosidade (Side Scatter)
T. cruzi – Trypanosoma cruzi
TC-Tox- Molécula formadora de poro
TCR – Receptor de células T
TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta (Transforming Growth Factor beta)
TLR – Receptor tipo Toll
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)
Tripo – Formas tripomastigotas do Trypanosoma cruzi
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UV – Ultravioleta
WHO – Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

RESUMO

O tempo de interação parasito-hospedeiro pode influenciar na resposta imune contra a infecção pelo *T. cruzi*. Porém suas particularidades ainda demandam de maiores estudos. No presente trabalho realizamos uma cinética das células que compõem a imunidade inata e as estimulamos *in vitro* com antígenos do *T. cruzi* nos tempos de 6 e 22 horas. Os dados foram obtidos por citometria de fluxo e a análise dos mesmos realizada utilizando o software Flow-Jo. Nossos dados demonstram que as subpopulações de monócitos e neutrófilos exercem uma participação no processo de defesa contra a infecção. O grupo dos monócitos inflamatórios foi encontrado nos pacientes IND, entretanto os neutrófilos não apresentaram diferenças. Outro ponto importante foi observado que as moléculas de reconhecimento, TLR- 2 e 4, apresentam diferenças nas expressões quando comparadas nos tempos de 6 e 22 horas, assim como CD-80 e HLA-DR principalmente nos pacientes IND, juntamente com uma maior produção de IL-10. Esses achados reforçam hipótese da imunoregulação nesses pacientes. Entretanto nossas análises nos pacientes CARD os receptores de reconhecimento se apresentaram diminuídos juntamente com a expressão da IL-12. De forma geral as maiores diferenças encontradas foi quando observadas na cultura após 22 horas. Podendo indicar que o tempo de contato do hospedeiro com o parasito influencia diretamente a modulação de uma resposta imune mais regulada ou exacerbada.

ABSTRACT

The time of host-parasite interaction may influence the immune response against *T. cruzi* infection. But its peculiarities still demand more studies. In the present work we performed a kinetics of the cells that make up the innate immunity and stimulated them in vitro with *T. cruzi* antigens at times of 6 and 22 hours. The data were obtained by flow cytometry and analyzed using Flow-Jo software. Our data demonstrate that subsets of monocytes and neutrophils exert a role in the defense against infection. The group of inflammatory monocytes was found in the IND patients, however the neutrophils showed no differences. Another important point was that the recognition molecules, TLR-2 and 4, showed differences in expressions when compared at 6 and 22 hours, as well as CD-80 and HLA-DR, mainly in IND patients, together with higher production of IL-10. These findings reinforce the hypothesis of immunoregulation in these patients. However our analyzes in the CARD patients the recognition receptors were decreased along with IL-12 expression. In general, the greatest differences were observed when observed in the culture after 22 hours. It may indicate that the contact time of the host with the parasite directly influences the modulation of a more regulated or exacerbated immune response.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma doença parasitária sistêmica, causada pelo parasito flagelado *Trypanosoma cruzi*, descrita há mais de cem anos pelo médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas (Chagas,1909). Chagas descreveu os aspectos morfológicos, sinais clínicos e o modo de transmissão da doença. Ressaltando um feito único na pesquisa mundial (Rassi e Marin-Neto, 2010).

Atualmente, a doença de Chagas é considerada um grave problema de saúde pública mundial. Estima-se que há cerca de oito milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (WHO 2019) (Figura 1), principalmente na América Latina, onde cerca de 25 milhões de pessoas estão sob risco de infecção (Stanaway e Roth, 2015). No Brasil, em torno de quatro milhões de pessoas podem estar infectadas e seis mil óbitos ocorram por ano (Stanaway e Roth, 2015).

Desde o início da década de 90, as medidas mais eficazes para controlar a doença de Chagas na América Latina foram através de programas de controle de vetores e exames em bancos de sangue (Pérez-Molina e Molina, 2018). A Iniciativa do Cone Sul do Sul (INCOSUR) foi lançada em 1991 para eliminar o principal vetor, o *Triatoma infestans*, e a transmissão por transfusão de sangue na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. Essa iniciativa levou a uma redução na transmissão do *T. cruzi* e sua interrupção foi certificada no Uruguai (1997), Chile (1999), Argentina (2001), Brasil (2000) e Paraguai (2002) (Incosur,2005; WHO 2015).

A doença de Chagas representou a quarta principal causa de morte entre doenças infecciosas. No período de 2000 a 2011, a patologia esteve entre as treze doenças mais negligenciadas no mundo, trazendo sérios prejuízos socioeconômicos aos países e aos seus portadores (Hotez *et al.*, 2007; Connors *et al.*, 2016; Costa De Albuquerque *et al.*, 2017). Devido ao grande fluxo migratório, a doença que era descrita somente em países endêmicos começa a se fazer presente em países da Europa, América do Norte, Ásia e Oceania (Schmunis e Yadon, 2010).

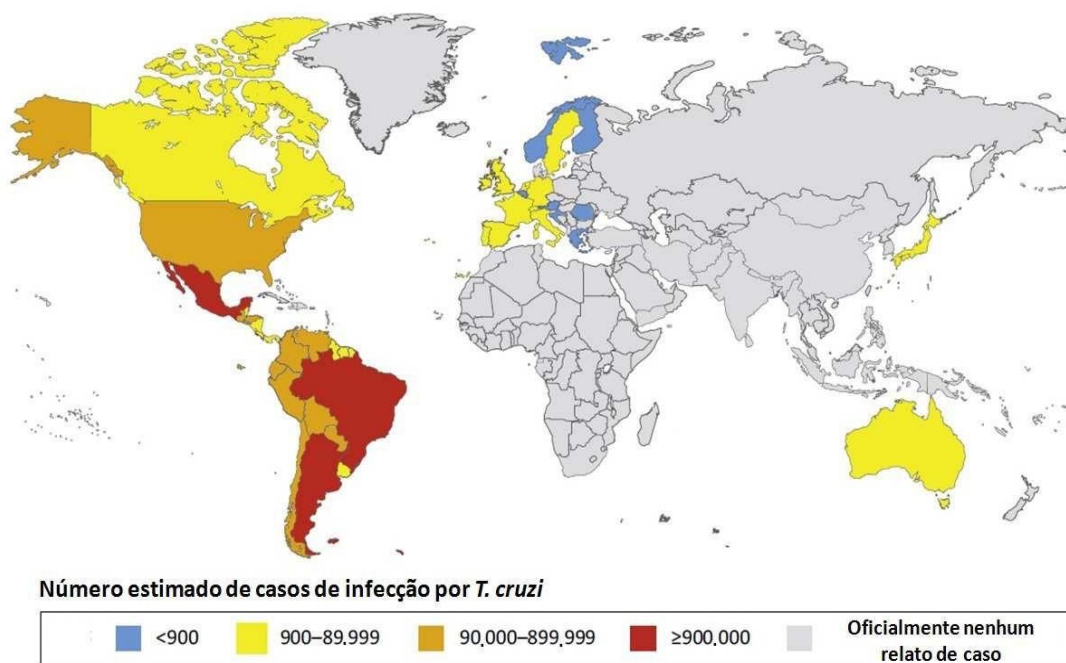


Figura 1. Estimativa dos casos globais da doença de Chagas. Em azul está representado parte do território do Europeu, onde os casos são poucos, podendo chegar a menos que novecentos (900). Em amarelo estão os países da América do Norte, Japão, Oceania e determinadas regiões da Europa, são estimados estão entre novecentos (900), casos de doença de Chagas podendo estar entre oitocentos, chegando até oitenta e nove mil (899.900). Já em vermelho esta representada a América Latina, onde há os maiores números de casos podendo ser superior a novecentos mil. (>900.000). Em cinza, a África e grande parte da Ásia, onde, oficialmente não se notificou nenhum caso da doença.

Fonte: Perez; Lymbery; Thompson, 2015.

O *T. cruzi* alterna seu ciclo de vida entre um hospedeiro invertebrado e hospedeiros vertebrados, dentre estes incluem o homem. Essa característica confere ao parasito estágios morfológicos complexos, permitindo sua sobrevivência a diferentes condições ambientais. A principal forma de transmissão da doença de Chagas ocorre por via vetorial (Figura 2), na qual o inseto vetor da subfamília dos *Triatominae*, ao realizar o repasto sanguíneo no seu hospedeiro, libera fezes e/ou urina com as formas infectantes do parasito (Brener, 1973; Rassi e Marin-Neto, 2010).

O ciclo se inicia quando as formas tripomastigotas metacíclicas entram na corrente sanguínea, invadindo uma série de células em vários tecidos (Figura 2). Dentro das células, as formas tripomastigotas se transformam na forma amastigota, aflagelada, dividindo-se por divisões binárias. Após a divisão, as formas amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneos, que lisam as células e voltam a circular no sangue periférico. Na circulação, essas tripomastigotas sanguíneas podem infectar novas células

do hospedeiro ou outros barbeiros durante o repasto sanguíneo. No intestino dos triatomíneos, evoluem para as formas replicativas epimastigotas. E posteriormente, diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas que serão liberadas junto as fezes/urina do barbeiro (Dias, 2000).

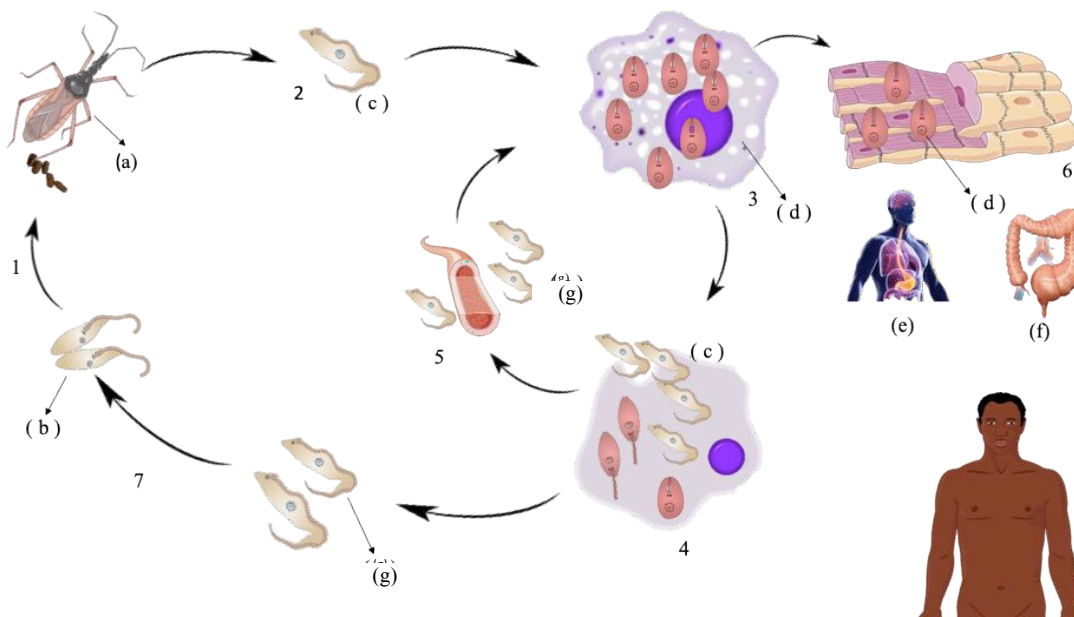


Figura 2. Representação esquemática do ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

(1) No intestino do inseto vetor (a), as formas epimastigotas (b), são liberadas nas fezes durante o repasto sanguíneo. (2) As formas tripomastigotas metacíclicas (c) caem na corrente sanguínea e invadem as células do hospedeiro vertebrado. (3) Dentro das células, as tripomastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas, forma aflagelada (d). (4) As formas amastigotas (d), passam por vários ciclos de divisão binária, que por fim rompendo a célula, são liberadas na corrente sanguínea como tripomastigotas sanguíneos (g). (5) Os tripomastigotas sanguíneos (g), são disseminados por todo o hospedeiro vertebrado, esse período é definido como fase aguda, sendo caracterizado por uma alta parasitemia. (6) Após esse período da fase aguda, a fase crônica começa a ser estabelecida e o parasito pode se alojar em vários tecidos do hospedeiro, predominantemente encontrado na forma amastigota (d), principalmente no tecido cardíaco e órgãos como: esôfago (e) e intestino (f). (7) O inseto vetor pode eventualmente se infectar com formas tripomastigotas sanguíneas (g) durante seu repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado. O ciclo termina quando os tripomastigotas sanguíneos ingeridos se diferenciam novamente em epimastigotas (b) que colonizam o tubo digestivo de um novo inseto.

Além da via vetorial, existem outras formas de transmissão da doença de Chagas e essas contribuem para sua disseminação, tais como transfusão sanguínea, via congênita, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e via oral. Esta última vem ganhando grande destaque epidemiológico em várias regiões do Brasil e em alguns outros países (Coura *et al.*, 2007). Diferentes tipos de alimentos como: suco de cana, açaí, sopas, carnes de caça ou caldos foram descritos contendo os insetos vetores triturados durante o preparo (Dias *et al.*, 2006). No Brasil foram registrados 1252 casos da doença de Chagas

entre 2007 e 2014 pelo Ministério da saúde (Brasil, 2019). Dentre essas, 70 % foram em decorrência da transmissão oral (Andrade *et al.*, 2014; Dario *et al.*, 2016).

1.1 Evolução clínica da doença de Chagas

Naturalmente, a doença de Chagas tem dois desfechos clínicos que apresentam características bem distintas: fase aguda e crônica. A fase aguda pode durar de 2 a 4 meses. Onde a elevada parasitemia e parasitismo tecidual acontecem, devido a intensa multiplicação do parasito (Coura e Dias, 2009; Rassi e Marin-Neto, 2010). Durante a essa fase, o diagnóstico parasitológico é facilmente realizado, devido a grande quantidade de parasitos circulantes, sendo evidente pela demonstração de tripomastigotas. Podendo ser realizados com observação de exames de sangue a fresco, o mais utilizado é o esfregaço de gota espessa (Chiari *et al.*, 1989; Leiby *et al.*, 2000).

Os sinais clínicos são variáveis, desde sinais locais como o sinal de Romanã e/ou chagoma de inoculação. Podem ser observados também quadros de febre, hepatoesplenomegalia, fraqueza e adenomegalia (Rassi e Marin-Neto, 2010). A presença do *T. cruzi* induz a liberação de mediadores inflamatórios que são responsáveis pela miocardite aguda, intensa e difusa (Andrade., 1999). Nessa fase, pode-se observar ativação de linfócitos T e B,, altos níveis de citocinas e anticorpos no plasma dos pacientes, o que leva a redução gradual da parasitemia, levando ao início da fase crônica (Coura e Dias, 2009). Já nessa fase, o diagnóstico pode ser feito através da detecção de anticorpos específicos por testes sorológicos ou indiretos, como os testes de hemocultura, ELISA e reação da cadeia da polimerase (PCR) (Chiari *et al.*, 1989; Leiby *et al.*, 2000).

Os pacientes na fase crônica podem ser classificados de acordo com as manifestações clínicas apresentadas, podendo ser: indeterminada (IND), digestiva (DIG), cardíaca (CARD) ou cardiodigestiva (CDG) (Macedo, 1980; Dias, 1989; Andrade *et al.* 2011).

A forma clínica IND é observada em aproximadamente 60% dos portadores da doença de Chagas. Os pacientes apresentam os testes sorológicos, parasitológicos ou ambos positivos para o *T. cruzi*, sem apresentar sintomas clínicos em decorrência da infecção. Contudo, cerca de 40% dos pacientes IND irão desenvolver alguma sintomatologia ao longo dos anos de infecção (WHO,2019; Macedo, 1980; Dias, 1989).

Dentre as manifestações da doença de Chagas, a forma CARD apresenta característica mais expressiva, afetando cerca de 30% dos pacientes (Marin-Neto; Simões

1999). Essa forma possui maior gravidade e progressão lenta, levando a falência cardíaca, arritmias, eventos trombóticos, bloqueios cardíacos de ordem variáveis, além de levar a morte súbita em alguns casos (Marin-Neto *et al.*, 2007).

A forma clínica DIG acomete em média 8% dos pacientes infectados (Coura e Dias, 2009). É caracterizada por intenso dano ao sistema digestivo, com presença de infiltrado de linfócitos, desenvolvimento de megacólon e megaesôfago. Que pode ser acompanhado pela destruição neuronal no sistema entérico (Resende e Moreira;2004).

Aproximadamente 2% dos pacientes podem desenvolver concomitantemente alterações cardíacas e digestivas, sendo classificados como pacientes da forma CDG.

Os mecanismos específicos envolvidos com o estabelecimento e/ou controle das diferentes formas clínicas da doença de Chagas são complexos. Não se sabe explicar como alguns indivíduos infectados desenvolvem formas graves da doença e nem o fato das manifestações clínicas serem tão heterogêneas. Acredita-se que estas manifestações são consequências de múltiplos fatores ligados ao *T. cruzi* (cepa, virulência, antigenicidade, tropismo, tamanho do inóculo) e ao hospedeiro (idade, sexo, raça, perfil da resposta imune) (Dias, 2000).

1.2 Resposta imune na doença de Chagas.

O *T. cruzi* interage com a resposta imune inata e adaptativa de uma maneira íntima e complexa. A capacidade da interação do protozoário com o hospedeiro permitiu que o mesmo pudesse resistir ao sistema imune e estabelecer uma infecção crônica (Acevedo *et al.*, 2018). Dentro do contexto da doença de Chagas, a resposta imune inata é amplamente conhecida e definida em dois momentos da infecção aguda: no controle da replicação do *T. cruzi*. E o processo inflamatório nos locais de infecção, que constitui principal causa de dano nos tecidos e perda funcional de órgãos (Brener e Gazzinelli, 1997; Junqueira *et al.*, 2010). Em relação à resposta imune adaptativa, a ativação de células B levando a produção de níveis substanciais de anticorpos e ativação adequada de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são essenciais para a diminuição de parasitemia na fase aguda e controle da infecção da fase crônica (Rottenberg *et al.*, 1993).

A resposta imune inata tem seu início quando células apresentadoras de antígenos (APC's) reconhecem antígenos do parasito através de receptores de reconhecimento padrão (PPR's). Os PPR's reconhecem padrões moleculares associados

a patógenos (PAMP's) (Kawai e Akira, 2010; Stahl et al., 2013). PAMP é um termo utilizado para definir um alvo não próprio ao sistema imune inato, e geralmente são expressos em uma série de microrganismos, porém ausente nas células do hospedeiro. Dentre os PAMP's que podem ser encontrados em protozoários, as ancoras de glicosilfosfatidil-inositol (GPI) são altamente expressos e ancoram proteínas na superfície dos parasitos que são agonistas de receptores tipo *Toll* (Campos et al., 2001; Akira et al., 2006; Buscaglia et al., 2006)

Os receptores tipo *toll* (TLR) (Figura 3) são os mais estudados dentro da doença de Chagas (Aoki et al., 2012). Localizados na superfície celular ou vesículas intracelulares são amplamente distribuídos em células apresentadoras de antígenos (APC's), como macrófagos e células dendríticas (Stahl et al., 2013).

Os receptores TLR-2 -4 e-9 compõem o grupo de maior destaque (Aoki et al., 2012), pois apresentam grande importância para o controle do parasitismo (Ropert et al., 2002; Junqueira et al., 2010). Sua atuação consiste na ativação de duas vias principais de sinalização: MyD88 (myeloid differentiation primary-response-gene-88) –dependente e uma cascata TRIF (*Toll/IL1R- domain containing adaptor protein inducing IFN beta*) - dependente. Quando ativados induzem produção de citocinas inflamatórias, recrutam células fagocíticas para o local da infecção. Que são importantes não só para o controle inicial da infecção, como na potencialização da resposta imune adaptativa (Takeuchi e Akira, 2010).

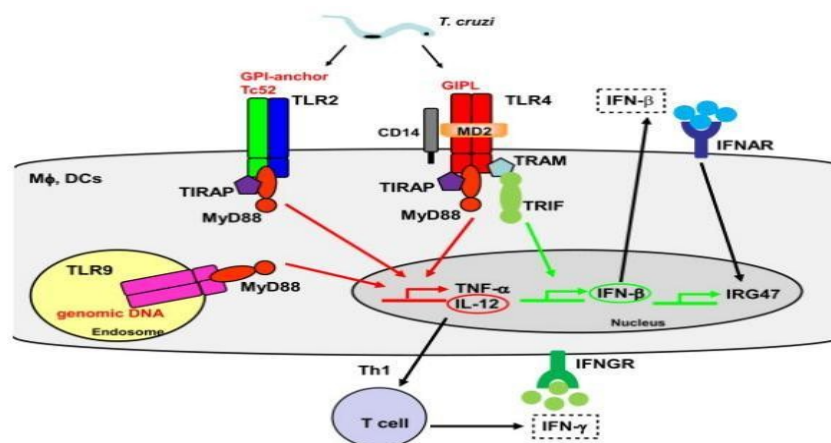


Figura 3. Cascatas de sinalização dos receptores da imunidade inata (*Toll Like Receptor-TLR*). Após o reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP's) pelos receptores do tipo *Toll*, estes sofrem mudanças conformacionais, permitindo o recrutamento de moléculas adaptadoras, como Myd88 e TRIF. O tipo de sinalização depende da combinação de diferentes PAMP's, resultando no recrutamento de diferentes moléculas adaptadoras. Estas, por sua vez, podem ativar NFκB, membros da família das MAP quinases e JUN quinases, induzindo a produção de mediadores inflamatórios, como IFN-γ.
 Fonte: Uematsu & Akira 2006-modificado Yama & Takeda 2010

Estudos experimentais usando animais *knock-out* para TLR-2 demonstraram elevada síntese de citocinas, após a infecção pelo *T. cruzi*, demonstrando um perfil imunoregulatório durante a infecção aguda (Bafica et al., 2006). Entretanto, (Gravina et al., 2013) sugeriram que a ativação de TLR-2 estimula funções diferentes de acordo com o tipo celular envolvido no hospedeiro. Dessa forma, esses autores mostraram que macrófagos podem induzir produção de TNF por células dendríticas com características imunoregulatórias, o que pode consequentemente influenciar a resposta imune adquirida e a produção de anticorpos contra o parasito.

O TLR-9, localiza-se em vesículas intracelulares, e é capaz de reconhecer fragmentos de DNA ou RNA do parasito. À medida que o *T. cruzi* invade a célula hospedeira e atinge o ambiente do fagolisossomo, moléculas de DNA dos parasitos lisadas estimulam a ativação de TLR- 9, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias (Bartholomeu et al., 2008; Cardoso et al., 2015). Contudo, os estudos *in vivo* demonstraram que TLR-2 e TLR-9 exercem funções diferentes na infecção pelo *T. cruzi*. Ao passo que o TLR-2 não afeta a parasitemia e a mortalidade dos animais. O receptor TLR-9 tem participação direta no controle da replicação parasitária e sobrevivência do camundongo (Gravina et al., 2013). Apesar de alguns dados demonstrarem que os camundongos *knock-out* para TLR-4 apresentam alta taxa de parasitemia e baixos níveis de produção de citocinas, que poderia indicar uma participação nos momentos iniciais da infecção, sua atuação ainda continua pouco esclarecida (Cardoso et al., 2015).

Sendo assim, os receptores do tipo TLR tem papel fundamental na resistência do hospedeiro a infecção pelo *T. cruzi*. A suscetibilidade do parasito está associada a produção de citocinas como a IL-12 e IFN- γ , essas direcionam uma resposta imune protetora, do tipo Th1 (Campos et al., 2004), que incluem a mobilização de moléculas de adesão e co-estimulatórias (Akira et al., 2006).

As moléculas de co-estimulação, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), localizadas nas APC's tem como receptor CD28 na superfície das células T (Thompson, 1995; Sharpe, 2009). A interação entre essas moléculas resulta na proliferação linfocitária, produção de citocinas e controle da parasitemia (Linsley e Ledbetter, 1993; Miyahira et al., 2003; Martins et al., 2004). As moléculas CD80 e CD86 podem ter suas funções diretamente relacionadas ao tempo que são expressas nas células. Visto que a molécula CD86 é a primeira a se mobilizar e pode mediar a resposta imune inicial em uma

interação com o receptor CD28. Contudo a molécula CD80, pode desempenhar uma função importante na inflamação crônica (Pinto, Medeiros, Fontes-Cal, *et al.*, 2018). A molécula CD28 também pode se ligar ao seu homólogo CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico) (Riley *et al.*, 2002). Essa ligação com CTLA-4 irá bloquear a produção de IL-12, juntamente com a progressão do ciclo celular, na fase G0 para G1, o que conseqüentemente levará a apoptose, diminuindo a resposta imune (Linsley *et al.*, 1994). As interações entre CD80 ou CD86 com CD28 ou CTLA-4 pode refletir na ativação dos linfócitos T e conseqüentemente na produção de citocinas.

As citocinas certamente estão envolvidas tanto na resistência contra o parasito quanto em mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da progressão da doença (Vitelli-Avelar *et al.*, 2008). O TNF- α , é produzido pelos macrófagos, e exerce uma importante função no controle do parasito nos primeiros momentos da infecção. Entretanto, a produção elevada de TNF- α pode resultar em uma resposta imune exacerbada, acarretando danos teciduais severos (Lannes-Vieira *et al.*, 2011).

De grande relevância para o controle da doença de Chagas, a IL-12 (Interleucina 12), tem sua atuação nas células *Natural killers* (NK), potencializando a ação citolítica e aumentando a síntese de interfeon-gama (IFN- γ) (Michailowsky *et al.*, 2001). O IFN- γ , aumenta a capacidade triponomicida dos macrófagos por conter a replicação intracelular, através da produção de oxido nítrico (Silva *et al.*, 1992).

Por outro lado, a produção de moléculas regulatórias pelos macrófagos, como a interleucina (IL)-10, por exemplo, tem a capacidade de reduzir a ativação promovida pelo IFN- γ , inibindo a liberação de NO (Silva *et al.*, 1992).

Em estudos realizados por (Gomes *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005), demonstraram que existe um perfil diferente na produção de citocinas entre os pacientes IND e CARD. Nos indivíduos com a forma clinica CARD observa-se níveis elevados de citocinas inflamatórias TNF- α e IFN- γ e baixa produção de IL-10. Em contrapartida, os pacientes IND apresentam um perfil inflamatório modulado, onde o diferencial é a presença de células produzindo níveis elevados de IL-10.

Assim, a hipótese que melhor explica as diferenças nas formas clinicas tão heterogêneas tem seu ponto central na imunoregulação. Onde os pacientes IND apresentam resposta imune capaz de eliminar os parasitos de forma eficiente ainda durante a fase aguda. Sendo essa resposta regulada, capaz de limitar a progressão da doença. Porém, os pacientes da forma clinica CARD, apresentam carga parasitária

controlada, contudo não conseguem desenvolver mecanismos imunoregulatórios efetivos, sendo alvos de inflamação persistente (Dutra e Gollob, 2008).

Ademais, quando se considera todas as interações imunes existentes, que são originadas durante a infecção pelo parasito, maiores esclarecimentos se fazem necessários. Sobretudo a cerca das populações e subpopulações celulares envolvidos, que muitas vezes possuem um envolvimento direto com a resistência e susceptibilidade ao *T. cruzi*. Além do repertório celular da imunidade adaptativa, os neutrófilos e monócitos, ambas células do sistema imune inato, atuam no processo de tentar eliminar o parasito (Bonney e Engman, 2008).

Os neutrófilos exercem função microbicida através da fagocitose, degranulação de proteínas líticas, produção de reativos intermediários de oxigênio, e recentemente através de NETosis - produção/liberação de NET's (*neutrophil extracellular traps*) que aprisionam e eliminam o patógeno de forma extremamente efetiva (Brinkmann *et al.*, 2004; Tecchio *et al.*, 2014). Essa população celular vem ganhando destaque nos processos inflamatórios crônicos, através da produção de citocinas, quimiocinas e proteases (Tecchio *et al.*, 2014). Na doença de Chagas, observou-se que os neutrófilos podem desempenhar funções de proteção e exacerbação da infecção, quando observados em linhagens diferentes de camundongos, possivelmente através da resposta Th1/Th2 (Chen *et al.*, 2001). Corroborando com esse achado (Gomes *et al.*, 2012), inferiram que neutrófilos de portadores da doença de Chagas não apresentam diferenças na capacidade fagocítica, quando comparados com indivíduos não infectados (NI). Contudo, neutrófilos dos pacientes IND apresentaram diminuição na produção de citocinas, que poderia influenciar na capacidade fagocítica dessa população de células nestes pacientes.

Já os monócitos fazem parte de uma subpopulação com uma plasticidade admirável, diferenciando em subpopulações celulares que podem executar funções variadas durante a infecção. (Geissmann *et al.*, 2010; Xiong e Pamer, 2015). Essas células possuem a capacidade de processar e apresentar antígenos, produzir citocinas e induzir sinais através de moléculas co-estimulatórias. Essas são algumas funções que demonstram a atuação para iniciar os eventos que desencadeiam a resposta imune (Souza *et al.*, 2007). No contexto da doença de Chagas, os monócitos de pacientes IND, apresentaram resposta reguladora, através da alta produção de IL-10, e um estado de ativação baixo, devido a expressão reduzida de HLA-DR (Souza *et al.*, 2007). Em contrapartida, os monócitos dos pacientes CARD, apresentaram expressão elevada de

TNF- α e HLA-DR, o que pode estar envolvido na indução da resposta inflamatória. Essa hipótese pode ser confirmada, devido aos monócitos de pacientes IND, apresentam baixa capacidade fagocítica, em relação a indivíduos NI. Entretanto, pacientes com IND apresentam a expressão de níveis elevados de óxido nítrico (NO), capaz de controlar a replicação parasitária (Gomes *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado por (Souza *et al.*, 2007) que a infecção pelo *T. cruzi* pode induzir a produção de citocinas, que consequentemente desencadeia menor expressão de moléculas CD80 e CD86 por monócitos, afetando a resposta dos linfócitos T, sendo essa uma das razões da sobrevivência do parasito no hospedeiro.

Recentemente, tem sido bem investigado o papel das subpopulações de monócitos na doença de Chagas (Pinto, Medeiros, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2018; Pérez-Mazliah *et al.*, 2018). Essas subpopulações foram classificadas de acordo com expressão de receptores CD14 (receptores de Lipopolissacarídeo) e CD16 (receptores da porção Fc para IgG) (Passlick *et al.*, 1989). Uma dessas populações de células, os monócitos CD14⁺ CD16⁺, são dotados da habilidade de produzir IL-10 e TNF *in vitro*. Os monócitos CD14^{low}CD16⁺ possuem a habilidade de produzir citocinas inflamatórias, tais como o TNF α , e IL-1 β após estímulos com LPS (Belge *et al.*, 2002).

Sendo assim, as subpopulações de monócitos ficaram assim classificadas. Monócitos clássicos (CD14⁺⁺ CD16⁻) esses apresentam alta capacidade de fagocitose, perfil pró-inflamatório. E em condições normais, representam 85-90% dos monócitos, além de possuir a capacidade de migrar para locais de lesão e infecção, onde se diferenciam em macrófagos inflamatórios (Thomas *et al.*, 2015). Os monócitos patrulheiros (CD14⁺CD16⁺⁺) mostram um perfil anti-inflamatório e um comportamento de patrulha *in vivo*, participando também dos processos de cicatrização (Cros *et al.*, 2010).

E também os monócitos intermediários (CD14⁺⁺ CD16⁺) esses, expressam os maiores níveis do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (Wong *et al.*, 2011; Pinto, Medeiros, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2018).

Nosso grupo demonstrou que após serem estimulados com antígenos do *T. cruzi in vitro*, os pacientes da forma clínica CARD, expressaram uma maior frequência dos monócitos intermediários em relação aos NI e IND. Sugerindo que pacientes com formas clínicas distintas da doença de Chagas, podem expressar frequências diferentes de subpopulações de monócitos (Pinto, Medeiros, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2018). Adicionalmente, Medeiros *et al.*, (2019), mostraram que os monócitos clássicos e

inflamatórios dos pacientes CARD, apresentam uma maior expressão de HLA-DR, quando comparados ao grupo NI. Foi possível ainda constatar que os monócitos clássicos do grupo IND apresentaram maior expressão de CD86, também em relação aos NI. Entretanto os monócitos patrulheiros não apresentaram diferenças nas suas moléculas de ativação em nenhum dos grupos de pacientes.

Apesar das subpopulações de monócitos possuírem funções diferentes (Linsley *et al.*, 1994), suas funções na doença de Chagas não foram totalmente elucidadas. A maioria dos trabalhos publicados envolvem os mecanismos específicos de monócitos e linfócitos na resposta imune contra o *T. cruzi*, e não focam no papel das subpopulações para o estabelecimento das formas clínicas na doença de Chagas (Pinto, Medeiros, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2018).

1.3 Interação parasito-hospedeiro

A superfície do parasito é recoberta por glicoproteínas da superfamília gp85 e mucinas ancoradas a membranas, através de moléculas glicosil-fosfatidil-inositol. A gp85 está associada com o processo de adesão celular do parasito pelo reconhecimento de proteínas celulares tais como: laminina, fibronectina, colágeno e citoqueratinas presentes na matriz extracelular ou na célula do hospedeiro. Essas interações desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular com mobilização do cálcio nas células do hospedeiro e do parasito (Burleigh e Woolsey, 2002; Epting *et al.*, 2010).

Após o processo de adesão, a invasão celular se dá pela internalização através da fagocitose ou endocitose. No processo de fagocitose, a célula emite pseudópodes com a participação ativa de filamentos de actina. Ao contrário, do processo de endocitose, onde a invaginação não depende da emissão de pseudópodes, mesmo assim há a contribuição direta dos filamentos de actina (Fernandes e Andrews, 2012; Barrias *et al.*, 2013).

Vários estudos relatam a participação dos lisossomos na formação do vacúolo parasitóforo no momento da invasão em células não fagocíticas (Figura 6), (Tardieux *et al.*, 1992; Andrade e Andrews, 2005), uma vez que sua característica ácida permite ativar a molécula formadora de poro (TC-TOX) (Andrews e Whitlow, 1989). Além de contribuir para a transformação dos tripomastigotas metacíclicos em amastigotas no citoplasma (Cardoso *et al.*, 2015). Contudo, independente da forma de invasão do parasito na célula, a fusão lisossomal é essencial para a retenção da mobilidade parasitaria.

Entretanto, o parasito escapa do ambiente extracelular, no qual possui menor possibilidade de sobrevivência (Andrade e Andrews, 2005).

Quando expostas ao *T. cruzi in vitro*, as APC's profissionais expressam moléculas efetoras e pró-inflamatórias, sugerindo que a inteiração entre o TLR- *T.cruzi*, potencializa e direciona a qualidade da resposta imune adaptativa (Campos *et al.*, 2004). Além de atuar na ativação de outros tipos celulares da resposta imune inata como as *Natural Killers*. Em modelos experimentais com infecção em camundongos *Knock-out* para MyD 88, nota-se menor produção de (IL-12, TNF- α , IFN- γ), juntamente com elevação da parasitemia e mortalidade (Campos *et al.*, 2004; Báfica *et al.*, 2006). Dessa forma fica claro que a ativação da resposta imune inata é crucial para o controle do parasitismo por *T. cruzi*, suprimindo a infecção e replicação do parasito.

Apesar de vários trabalhos mostrarem a importância da resposta imune inata e adaptativa no controle e/ou desenvolvimento da cardiopatia, ainda é pouco conhecido como a interação parasito e células do hospedeiro podem levar as diferentes formas clínicas. Dessa forma, acreditamos que o tempo de inteiração do parasito com as células do sistema imune inato pode influenciar o mecanismo imune que leva a perda ou não das funções reguladoras. Pouco se sabe sobre o tempo de interação parasito-células da imunidade inata, portanto nosso estudo tem como proposta uma cinética das células da imunidade inata em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas após estímulo com antígenos do *Trypanosoma cruzi*.

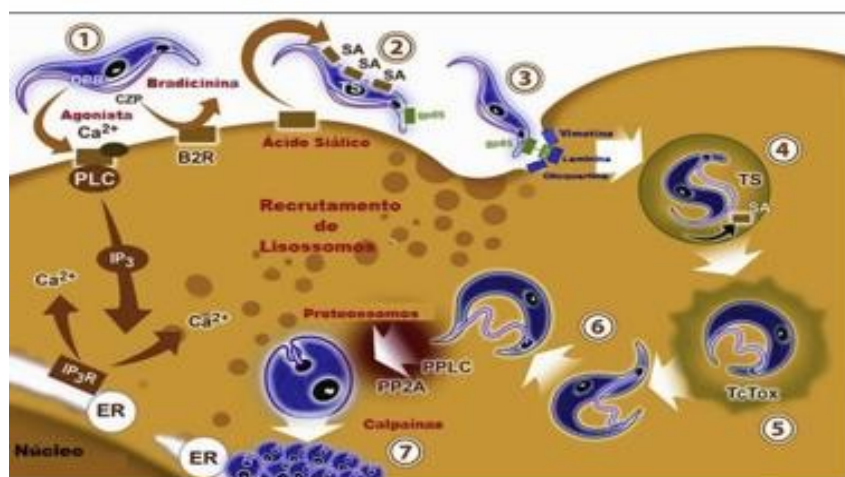


Figura 4. Processo de invasão celular e diferenciação do *T. cruzi*.

(1) Oligopeptidase B (OPB) envolvida na sinalização de cálcio e regulação da exocitose lisossomal. Cruzipán (CZP) gera bradicinina que se liga ao receptor de bradicinina do tipo B (B2R). (2-3) Transialidase/gp85 participam da invasão celular ligando-se a citoqueratina, laminina e vimetina na célula do hospedeiro. (4-5) O escape do vacúolo fagolisossomal é atribuído a atividade da transialidase e a expressão da hemolisina TcTox. (6) Diferenciação para formas amastigotas é realizada por fosfolipase C (PPLC), fosfatase 2ª (PP2A) e proteossomos. (7) Calpaínas estão envolvidas na proliferação das formas amastigotas.

Fonte: Adaptado de Osorio., *et al* (2012)

Nossa hipótese é que o tempo de interação entre monócitos e neutrófilos com antígenos de *T. cruzi* influencia a produção de citocinas, moléculas co-estimulatórias e de ativação nessas células imunes inatas. Dessa forma, acreditamos que tentar desvendar os aspectos dessa relação parasito-hospedeiro, contribuirá para maiores esclarecimentos dos mecanismos imunoregulatórios envolvidos na manutenção da doença de Chagas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil imunofenotípico em neutrófilos e subpopulações de monócitos por cinética celular após estimulação com antígenos de *T. cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

I- Avaliar a expressão de citocinas, moléculas de ativação e reconhecimento em neutrófilos e subpopulações de monócitos de pacientes portadores da doença de Chagas após a estimulo com antígenos do *T. cruzi* nos tempos de 6 e 22 horas.

3 POPULAÇÃO DE ESTUDO E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo atende aos aspectos fundamentais da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Todos os indivíduos incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Anexo B) e da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Nº 14/2006) (Anexo C).

3.2 População de estudo

Os pacientes portadores da doença de Chagas foram recrutados no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas Alda Falcão do Instituto René Rachou (IRR), sob os cuidados da Dra. Silvana Eloi-Santos. Os critérios e descrição das formas clínicas foram baseados de acordo com Rocha et al., 2007. Os pacientes não infectados são pertencentes ao convívio pessoal, sua procedência demográfica é conhecida.

Grupo de indivíduos não infectados (NI): Constituído por indivíduos saudáveis que apresentarem pelo menos dois resultados negativos para a doença de Chagas, juntamente com ausência de sinais clínicos da doença de Chagas e ausência de alterações cardíacas.

Grupo de pacientes com a forma clínica indeterminada (IND): Constituído por pacientes que apresentam positividade sorológica e/ ou parasitológica para doença de Chagas; ausência de sintomas e/ ou sinais da moléstia; eletrocardiograma (ECG) convencional normal; estudos radiológicos do coração, esôfago e cólon normais.

Grupo de pacientes que apresentam a forma clínica cardíaca (CARD): Constituído por pacientes que apresentam positividade sorológica e/ ou parasitológica para doença de Chagas, ECG com alterações avançadas, extra-sístoles ventriculares frequentes, aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole e uma silhueta cardíaca aumentada.

3.3 Critérios de inclusão

Após avaliação clínica, eletrocardiográfica e laboratorial, os pacientes chagásicos foram selecionados de acordo com os seguintes critérios:

- Diagnóstico sorológico para a doença de Chagas, caracterizado pela presença de pelo menos duas reações sorológicas positivas dentre as três técnicas empregadas (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA, hemoaglutinação e reação de imunofluorescência indireta);
- Idade compreendida entre 30 e 75 anos;
- Níveis de tensão arterial dentro de faixa na normalidade (sistólica <130 mmHg e diastólica <90 mmHg).
- Presença de alterações eletrocardiográficas compatíveis com associação do bloqueio completo do ramo direito e hemibloqueio anterior esquerdo;
- Ausência de evidências clínicas e complementares de acometimento cardíaco não relacionado à doença de Chagas;
- Ausência de condições clínicas que possam alterar a função cardiocirculatória;
- Conclusão dos exames propostos;
- Consentimento voluntário de participação na pesquisa.

3.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo todos os pacientes que não preencheram os critérios de inclusão definidos acima e os que apresentaram:

- Impossibilidade ou ausência de disponibilidade para a realização dos exames propostos;
- Hipertensão arterial sistêmica (HAS), definida operacionalmente como: pressão arterial medida durante o exame físico 160/95 mmHg, em mais de uma oportunidade ou pressão arterial medida durante o exame físico entre 140-159/90-94 mmHg, em mais de uma oportunidade, associado a: 1) história de hipertensão arterial sistêmica, ou; 2) quarta bulha ao exame físico, ou 3) provável sobrecarga ventricular esquerda ao ECG pelo critério de Romhilt-Estes, ou 4) evidências de dilatação aórtica à radiografia de tórax;

- Evidências clínicas ou laboratoriais de hipotireoidismo ou hipertireoidismo não induzido por medicamento;
- Diabetes mellitus ou tolerância reduzida à glicose, conforme anamnese, dosagem de glicemia em jejum e, se necessário, prova de tolerância oral à glicose;
- Episódio prévio sugestivo de doença reumática aguda;
- Doença pulmonar obstrutiva crônica, evidenciada pela história clínica, exame físico, ECG e alterações radiológicas sugestivas;
- Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420g de etanol (média diária acima de 60g de etanol);
- Evidências clínicas, eletrocardiográficas e/ou ergométricas de cardiopatia isquêmica;
- Outras cardiopatias;
- Gravidez, definida por critérios laboratoriais;
- Qualquer outra doença sistêmica significativa crônica ou aguda que possa interferir nos resultados dos métodos propostos.
- Anemia significativa, definida arbitrariamente com hemoglobina menor que 10g/dL;
- Distúrbios hidroeletrólíticos, especificamente, níveis séricos anormais de potássio e sódio;
- Insuficiência renal, definida pelo aumento dos níveis de creatinina e uréia plasmáticas, associadas ou não às manifestações clássicas de uremia.

3.5 Desenho experimental

A figura 5 representada pela linha do tempo indica o desenho experimental realizado nesse trabalho.

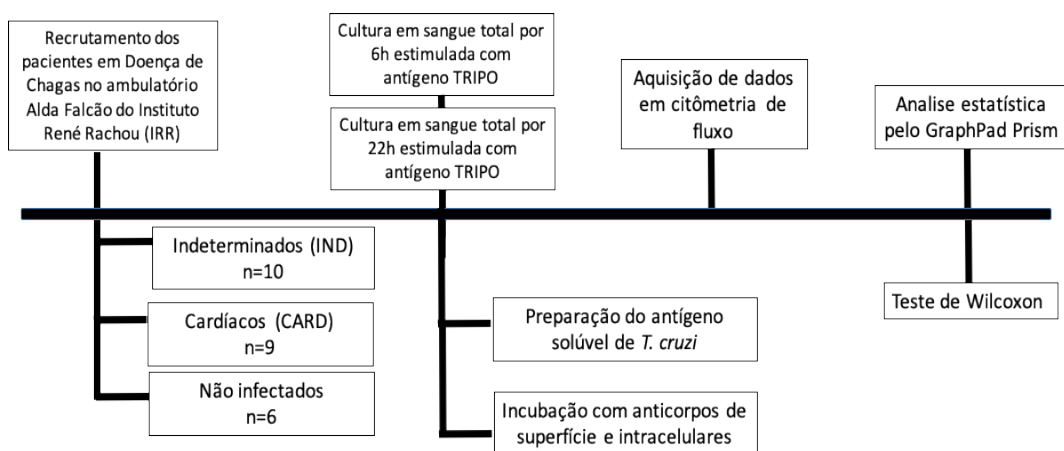


Figura 5: Desenho experimental. Nos quadrados estão todas as etapas percorridas para realização do trabalho, desde a coleta até as análises estatísticas.

3.6 Preparação dos antígenos derivados da forma tripomastigota do *T. cruzi* (TRYPO)

As formas tripomastigotas foram obtidas de cultura de células LLC mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os parasitos da cepa CL Brener foram lavados 3 vezes em solução salina (PBS 0,15M pH=7,4) por centrifugação e a massa úmida congelada e degelada três vezes. Completando-se a ruptura total dos parasitos por homogeneização em tubos Potter Elvejen a 21.000g 5 vezes por 60 segundos cada, com 30 segundos de intervalo em banho de gelo. Subsequentemente, as suspensões foram centrifugadas a 50.000g durante 60 minutos a 4°C com PBS. O fluido sobrenadante límpido foi coletado, dialisado por 48 horas a 4°C, esterilizado por filtração em filtro Millipore 0.45µm e mantido em pequenas alíquotas de 1mL a -70°C até o uso. A contenção de antígenos proteicos foi dosada através do equipamento NanoDrop (Thermo Scientific) e a concentração final utilizada foi de 20µg/mL.

3.7 Amostras

O sangue periférico dos pacientes que participaram do estudo foi coletado em tubo Vacuntainer estéril contendo heparina. O plasma foi separado por centrifugação após a coleta e congelado a -80°C até a quantificação das moléculas.

3.8 Culturas do sangue total

As culturas realizadas no referido trabalho seguiram tempos distintos, porém a mesma metodologia como descrita a seguir. Alíquotas de 1mL de sangue total foram adicionadas a tubos de polipropileno de 14mL (Falcon, E.U.A). O sangue periférico foi incubado na presença de meio Rosweel Park Memorial Institute - RPMI (Gibco), recebendo a denominação de cultura controle (Controle) ou na presença de antígenos solúveis derivados da forma tripomastigota do *T. cruzi* (TRYPO), com uma concentração final de 20µg/mL, recebendo a denominação de cultura com estímulo específico (TRYPO). Os tubos foram previamente incubados durante 6/18 horas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C (Forma Scientific EUA). Em seguida, foram adicionados a todos os tubos de cultura 20µL de Brefeldina A (Sigma, EUA) na concentração de 1mg/mL. As amostras foram incubadas por mais 2/4 horas em estufa nas mesmas condições acima. A

utilização da Brefeldina assegura a retenção das moléculas no interior da célula, uma vez que essa substância interfere no transporte intracelular quando rompe o aparelho de Golgi. Após a incubação, 200µL de EDTA (Sigma, EUA) na concentração final de 2mM foram adicionados diretamente às culturas. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 15 minutos em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Esse procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados e comparáveis.

3.9 Aquisição em citometria de fluxo

Nos tubos da cultura de sangue total foi adicionado 3mL de PBS-W (PBS pH 7,4, contendo 0,5% BSA e 0,1% de azida sódica) e foram centrifugados a 400g por 10 minutos a 18°C. O sobrenadante foi aspirado deixando um volume final de 2mL. Foram transferidos 200µL deste sangue para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon, EUA) previamente identificados e com os anticorpos de superfície (Tabela 1) correspondentes e, em seguida, incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lisadas e fixadas em 2mL de solução de lise (50.000USP/L de heparina, 2,85g/L de citrato de sódio, 30mL/L de dietilenoglicol e 54mL/L de formaldeído), por 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Para a detecção dos marcadores intracitoplasmáticos foi acrescentado aos tubos 2,5mL de PBS-P (PBS, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) seguido por uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação foi adicionado 20µL de solução anticorpo intracitoplasmático conjugado com fluorocromos (Tabela1) e PBS-P a concentração 1:5 aos respectivos tubos, e posteriormente incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 1mL de PBS-P e em seguida, com 1mL de PBS-W. No final, foram adicionados 200µL de solução fixadora – MFF (10g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2 reagentes) (SIGMA, E.U.A). As amostras contendo a suspensão celular foram utilizadas para aquisição de dados em citometro de fluxo (FACSAria - BD, E.U.A). Foram analisados em torno de 100.000 eventos totais.

3.10 Aquisição e estratégia de análise dos dados

O citômetro de fluxo (FACS LDRFortessa - BD, E.U.A) utilizado neste trabalho é equipado com quatro lasers – azul, vermelho, violeta e ultravioleta (UV) que permite detecção de 10 parâmetros simultaneamente: tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2), fluorescência do tipo 3 (FL3) e fluorescência do tipo 4 (FL4), fluorescência do tipo 5 (FL5), fluorescência do tipo 6 (FL6), fluorescência do tipo 7 (FL7) e fluorescência do tipo 8 (FL8), sendo que a última fluorescência não foi utilizada no presente estudo. FL1, FL2, FL3, FL4, FL5, FL6, FL7 correspondem aos sinais luminosos emitidos pela excitação de FITC, PE, PerCP, APC, APCCy7, PE-Cy7 e BV421, simultaneamente. A identificação de populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual destas populações e subpopulações, foram feitas através do software *FlowJo*. Foram coletados 60.000 eventos dentro da população de linfócitos (Figura 8).

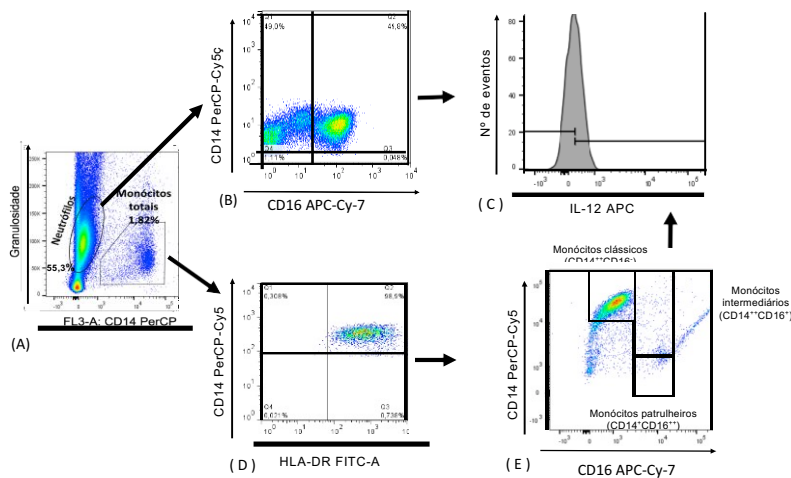


Figura 6: Estratégias de análise das populações de neutrófilos e subpopulações de monócitos. A imagem “A”, representa a seleção do gate de neutrófilos e monócitos, por granulosidade (SSC) x versus densidade de fluorescência- CD14. A imagem “B”, indica Gráfico de dispersão pontual de densidade de fluorescência (CD14 PerCP) versus densidade de fluorescência-1 (CD16 APCCy7), selecionando os neutrófilos. A imagem “C”, indica os histogramas com intensidade média de fluorescência das moléculas de interesse. As imagens “D e E”, indicam os gráficos de dispersão pontual de densidade de fluorescência (CD14 PerCP) versus densidade de fluorescência-1 (HLA-DR FITC-A) e CD14 PerCP) x CD16 APCCy7, para definição das subpopulações de monócitos: Monócitos clássicos CD14⁺⁺ CD16⁻ (MC), inflamatórios CD14⁺⁺ CD16⁺ (MI) e patulheiros CD14⁺⁺ CD16⁺⁺ (MP).

Tabela 1. Anticorpos de superfície e intracitoplasmáticos para citometria de fluxo.

Anti	Clone	Marca	Fluorescência	Tipo	Isotipo	Fonte
CD14	MφP9	BD Bioscience	PerCP	Monoclonal	IgG2b, κ	Mouse
CD 16	3G8	BD Bioscience	APCCy7	Monoclonal	IgG1, κ	Mouse
CD282	TL2.1	eBioscience	PECy7	Monoclonal	IgG2a, κ	Mouse
CD284	HTA125	BioLegend	BV421	Monoclonal	IgG2a, κ	Mouse
CD-80						
CD-86	2331(FUN1)	BD Bioscience	APC	Monoclonal	IgG1, κ	Mouse
HLA-DR	G46-6	BD Bioscience	FITC	Monoclonal	IgG2a, κ	Mouse
IL-8	E8N1	BioLegend	APC	Monoclonal	IgG1, κ	Mouse
IL-10	127107	RnD systems	APC	Monoclonal	IgG1	Mouse
IL-12	C11.5	BioLegend	APC	Monoclonal	IgG1, κ	Mouse

3.11 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA). Foi realizado o teste de normalidade e os dados apresentaram distribuição não paramétrica. Para verificar diferenças estatísticas entre as culturas sem estímulo e as culturas com estímulo de TRYPO foi realizada análise pareada empregando o teste de Wilcoxon.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da frequência de neutrófilos e subpopulações de monócitos

A figura 7 representa a frequência dos neutrófilos e subpopulações de monócitos de indivíduos NI e pacientes com as formas IND e CARD, após 6 e 22 horas de estimulação *in vitro* com TRYPO. Observa-se que não houve diferenças significativas na frequência dos neutrófilos (A), monócitos clássicos (B) e patrulheiros (D) nos grupos de pacientes estudados (Figura 9). Porém a análise dos dados demonstra uma redução significativa na frequência dos monócitos inflamatórios (C) no grupo de indivíduos NI e pacientes com a forma CARD, após 22 horas de cultura de estimulação antigênica (Figura 7).

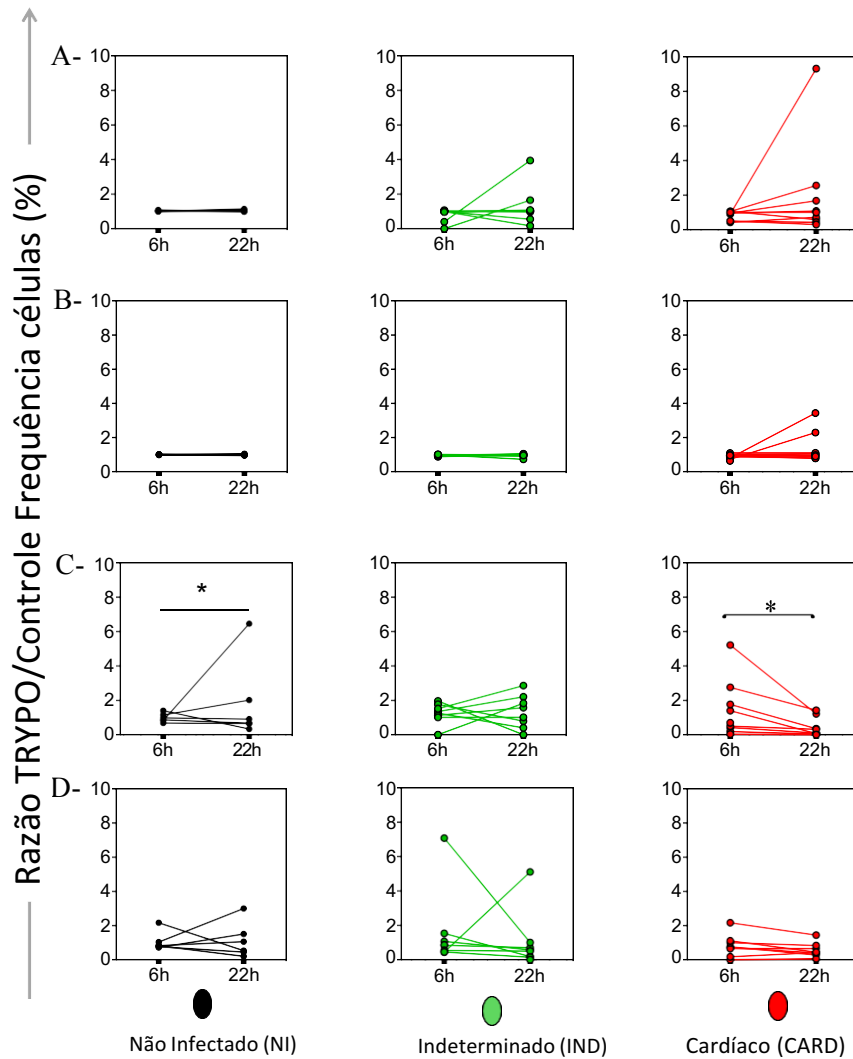


Figura 7. Análise da frequência de neutrófilos e monócitos (A), Monócitos clássicos (B), Monócitos inflamatórios (C) e Monócitos patrulheiros (D). Os grupos analisados foram indivíduos não infectados (NI, preto, n = 6) e pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada (IND, verde, n = 9) e cardíaca (CARD, vermelho, n = 10), após 6 e 22 horas de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRYPO). A frequência das populações celulares está representada pela razão TRYPO/Controle. O gráfico de pontos pareados indicam indivíduos não infectados (NI, preto, n= 6), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND, verde, n= 10) e cardíaca (CARD, vermelho, n=9). Diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$) detectadas pelo teste dos pontos pareados de Wilcoxon foram indicadas por linhas e asterisco (*).

4. 2 Análise da expressão de receptores de reconhecimento

Os dados na figura 8 estão representados pela intensidade média de fluorescência (MFI) da molécula TLR-2 através razão TRYPO/Controle. A análise dos dados não indicou nenhuma diferença significativa na expressão de TLR-2 nos indivíduos NI e nos pacientes IND (Figura 8 A, B e D). Já os pacientes CARD demonstraram uma queda significativa da expressão dessa molécula nos monócitos inflamatórios após cultura de 22 horas (Figura 8C).

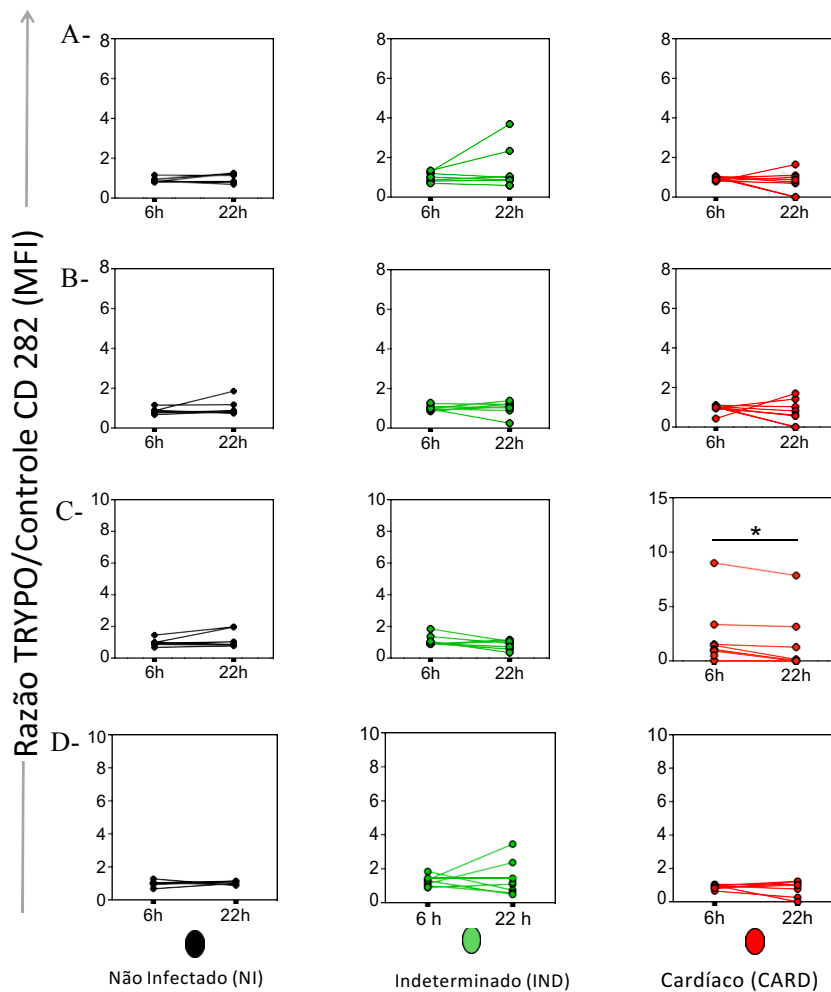


Figura 8: Avaliação da expressão do receptor CD-282. Em neutrófilos (A), Monócitos clássicos (B), Monócitos inflamatórios (C) e Monócitos patrulheiros (D). Os grupos analisados foram indivíduos não infectados (NI, preto, n = 6) e pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada (IND, verde, n = 9) e cardíaca (CARD, vermelho, n = 10), após 6 e 22 horas de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRYPO). A intensidade das moléculas representada pela razão TRYPO/Controle. O gráfico de pontos pareados indicam indivíduos não infectados (NI, preto, n= 6), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND, verde, n= 10) e cardíaca (CARD, vermelho, n=9). Diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$) detectadas pelo teste dos pontos pareados de Wilcoxon foram indicadas por linhas e asterisco (*).

Os dados na figura 9 estão representados pela intensidade média de fluorescência (MFI) da molécula TLR-4 através razão TRYPO/Controle. A análise dos dados indicou uma redução significativa na expressão de TLR-4 nos neutrófilos de pacientes CARD após cultura de 22 horas comparado a cultura de 6h (Figura 9A). Nas demais subpopulações celulares não se observou diferenças significativas nos indivíduos NI e pacientes IND e CARD entre os tempos de cultura avaliados (Figura 9A-B-C-D).

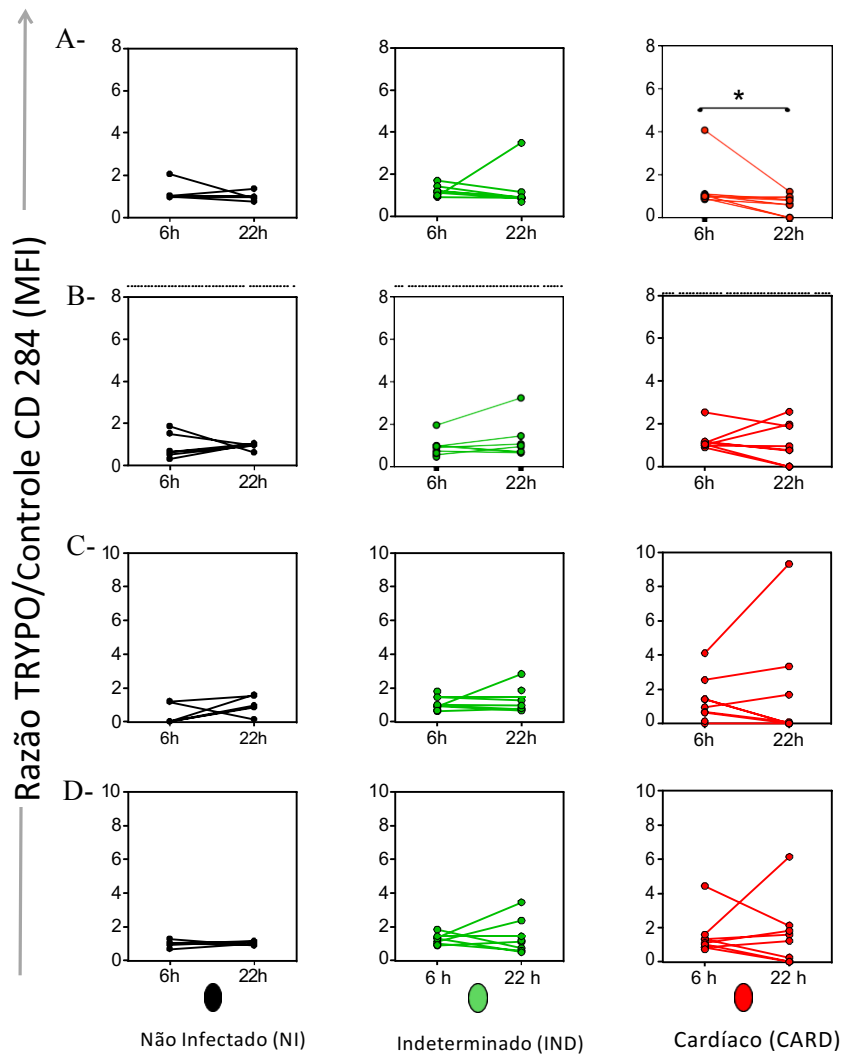


Figura 9: Avaliação da expressão do receptor CD-284. Em neutrófilos (A), Monócitos clássicos (B), Monócitos inflamatórios (C) e Monócitos patrulheiros (D). Os grupos analisados foram indivíduos não infectados (NI, preto, n = 6) e pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada (IND, verde, n = 9) e cardíaca (CARD, vermelho, n = 10), após 6 e 22 horas de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRYPO). A intensidade das moléculas representada pela razão TRYPO/Controle. O gráfico de pontos pareados indicam indivíduos não infectados (NI, preto, n= 6), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND, verde, n= 10) e cardíaca (CARD, vermelho, n=9). Diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$) detectadas pelo teste dos pontos pareados de Wilcoxon foram indicadas por linhas e asterisco (*).

Os dados na figura 10 estão representados pela intensidade média da molécula TLR-9 da através razão TRYPO/Controle. A análise dos dados demonstrou que não houve diferenças significativas na expressão de TLR-9 nas populações celulares entre os tempos de 6 e 22 horas nos grupos avaliados (Figura 10A-B-C-D).

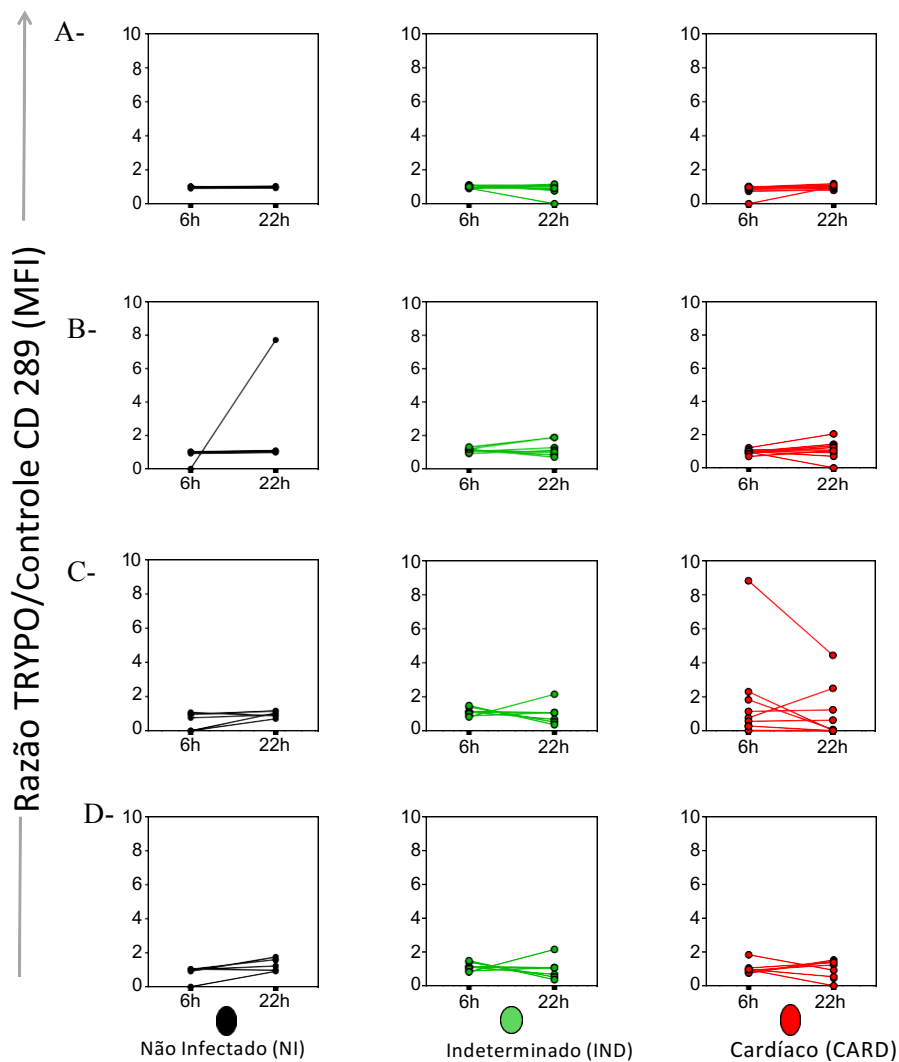


Figura 10. Avaliação da expressão do receptor CD-289. Em neutrófilos (A), Monócitos clássicos (B), Monócitos inflamatórios (C) e Monócitos patrulheiros (D). Os grupos analisados foram indivíduos não infectados (NI, preto, n = 6) e pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada (IND, verde, n = 9) e cardíaca (CARD, vermelho, n = 10), após 6 e 22 horas de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRYPO). A intensidade das moléculas representada pela razão TRYPO/Controle. O gráfico de pontos pareados indicam indivíduos não infectados (NI, preto, n= 6), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND, verde, n= 10) e cardíaca (CARD, vermelho, n=9). Diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$) detectadas pelo teste dos pontos pareados de Wilcoxon foram indicadas por linhas e asterisco (*).

4.3 Análise da expressão de moléculas de ativação

Os dados na figura 11 estão representados pela MFI de HLA-DR através da razão TRYPO/Controle. Observa-se o aumento significativo de HLA-DR nos monócitos inflamatórios e patrulheiros em NI após estimulação na cultura de 22 horas (Figura 11C-D). Diferenças significativas não foram observadas nas em neutrófilos e monócitos clássicos entre os tempos para os grupos avaliados (Figura 11 A-B).

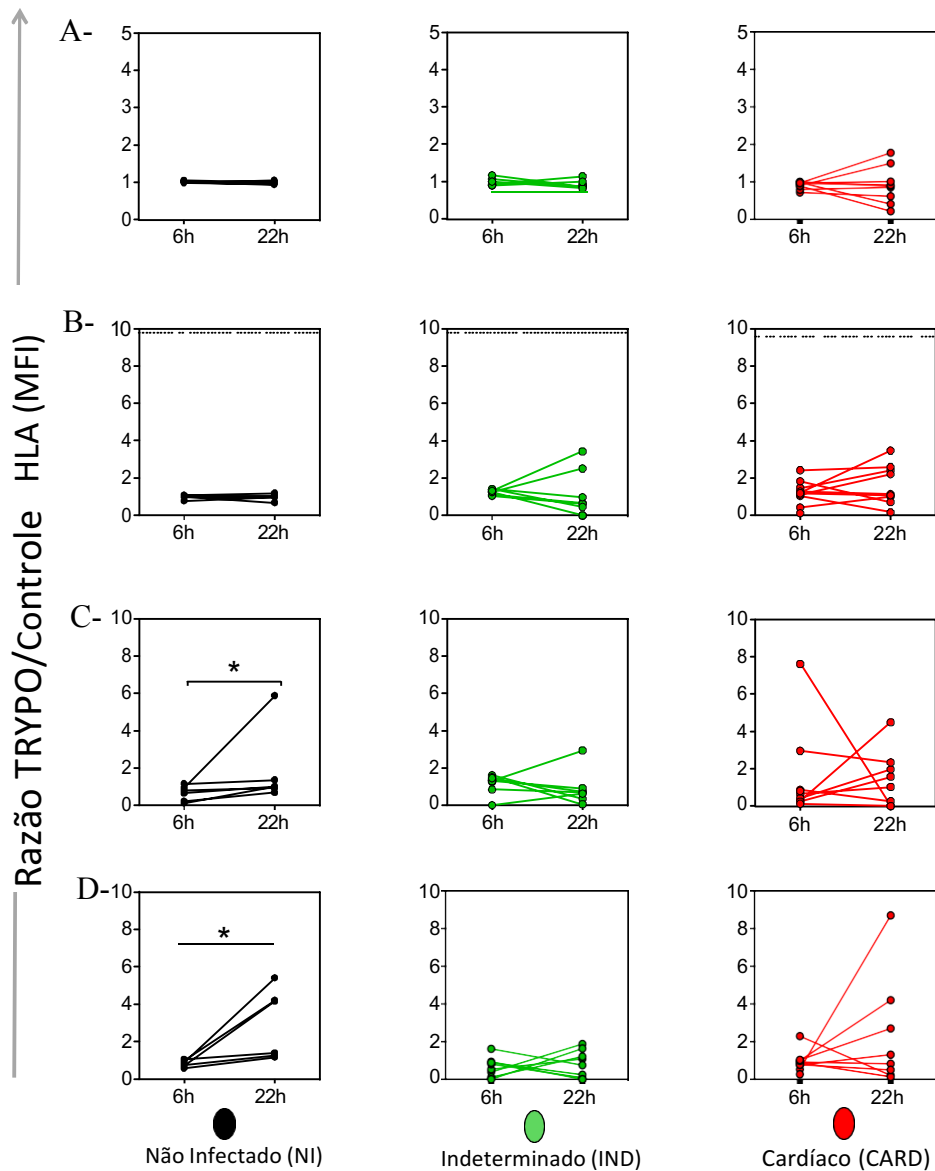


Figura 11. Avaliação da expressão da molécula de ativação HLA-DR. Em neutrófilos (A), Monócitos clássicos (B), Monócitos inflamatórios (C) e Monócitos patrulheiros (D). Os grupos analisados foram indivíduos não infectados (NI, preto, n = 6) e pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada (IND, verde, n = 9) e cardíaca (CARD, vermelho, n = 10), após 6 e 22 horas de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRYPO). A intensidade das moléculas representada pela razão TRYPO/Controle. O gráfico de pontos pareados indicam indivíduos não infectados (NI, preto, n= 6), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND, verde, n= 10) e cardíaca (CARD, vermelho, n=9). Diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$) detectadas pelo teste dos pontos pareados de Wilcoxon foram indicadas por linhas e asterisco (*).

Os dados na figura 12 estão representados pela MFI da molécula CD80 através da razão TRYPO/Controle. Observa-se a redução significativa da expressão de CD80 em neutrófilos dos indivíduos NI, na cultura de 22 horas (Figura 12 A). Contudo, a expressão de CD80 nos monócitos inflamatórios e patrulheiros em IND apresentou um aumento significativo após estimulação na cultura de 22 horas (Figura 12C-D). Diferenças

significativas não foram observadas em monócitos clássicos entre os tempos para os grupos avaliados (Figura 14 B).

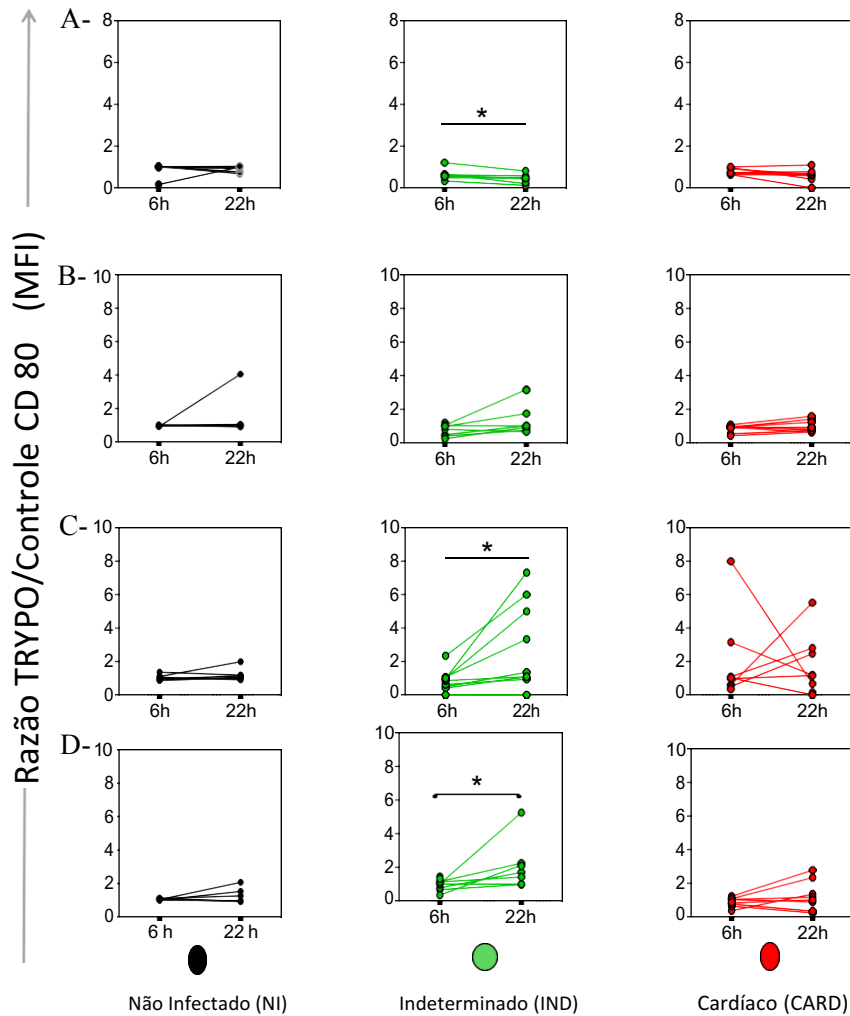


Figura 12. Avaliação da expressão da molécula de co-estimulação CD80. Em neutrófilos (A), Monócitos clássicos (B), Monócitos inflamatórios (C) e Monócitos patrulheiros (D). Os grupos analisados foram indivíduos não infectados (NI, preto, n = 6) e pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada (IND, verde, n = 9) e cardíaca (CARD, vermelho, n = 10), após 6 e 22 horas de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRYPO). A intensidade das moléculas representada pela razão TRYPO/Controle. O gráfico de pontos pareados indicam indivíduos não infectados (NI, preto, n= 6), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND, verde, n= 10) e cardíaca (CARD, vermelho, n=9). Diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$) detectadas pelo teste dos pontos pareados de Wilcoxon foram indicadas por linhas e asterisco (*).

Os dados na figura 13 estão representados pela MFI da molécula CD86 através da razão TRYPO/Controle. A análise dos dados demonstrou que não houve diferenças significativas na expressão da molécula de co-estimulação CD86 nas populações celulares de indivíduos entre os tempos nos grupos avaliados (Figura 13 A-B-C-D).

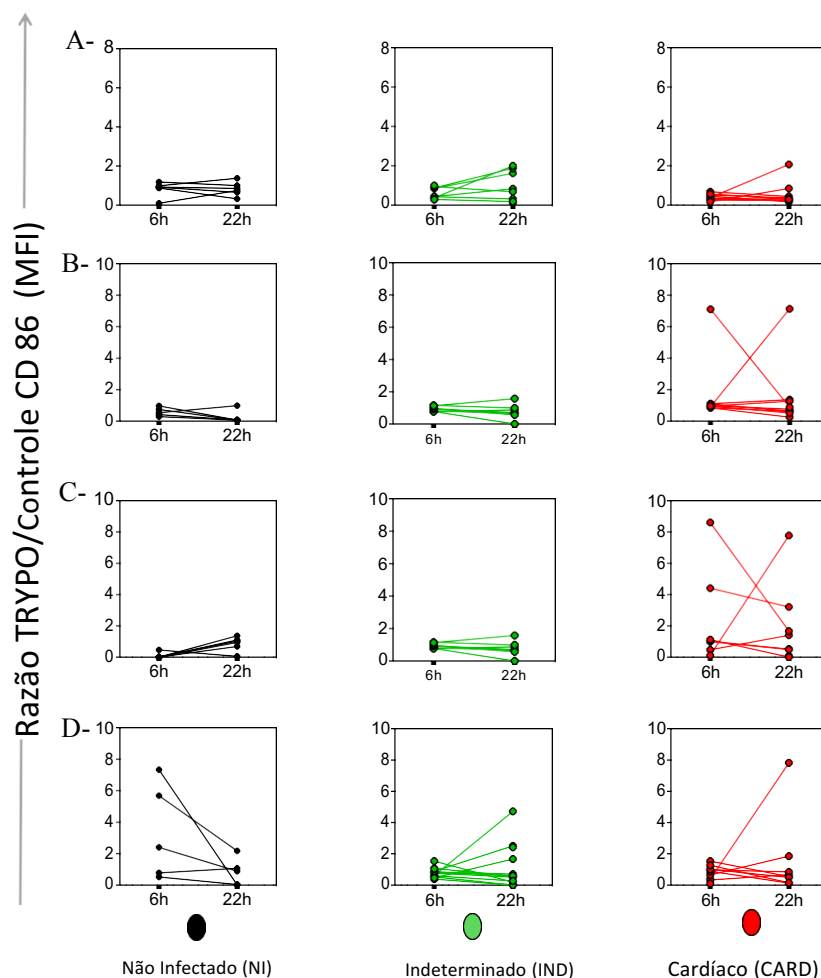


Figura 13. Avaliação da expressão da molécula de co-estimulação CD86. Em neutrófilos (A), Monócitos clássicos (B), Monócitos inflamatórios (C) e Monócitos patrulheiros (D). Os grupos analisados foram indivíduos não infectados (NI, preto, n = 6) e pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada (IND, verde, n = 9) e cardíaca (CARD, vermelho, n = 10), após 6 e 22 horas de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRYPO). A intensidade das moléculas representada pela razão TRYPO/Controle. O gráfico de pontos pareados indicam indivíduos não infectados (NI, preto, n= 6), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND, verde, n= 10) e cardíaca (CARD, vermelho, n=9). Diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$) detectadas pelo teste dos pontos pareados de Wilcoxon foram indicadas por linhas e asterisco (*).

4.4 Análise da expressão de citocinas

A expressão de IL-8 apresentou redução significativa nos monócitos clássicos de NI após cultura de 22 horas (Figura 14 B). Nas demais subpopulações celulares não se observou diferenças significativas entre os tempos nos grupos avaliados (Figura 14 A-C-D).

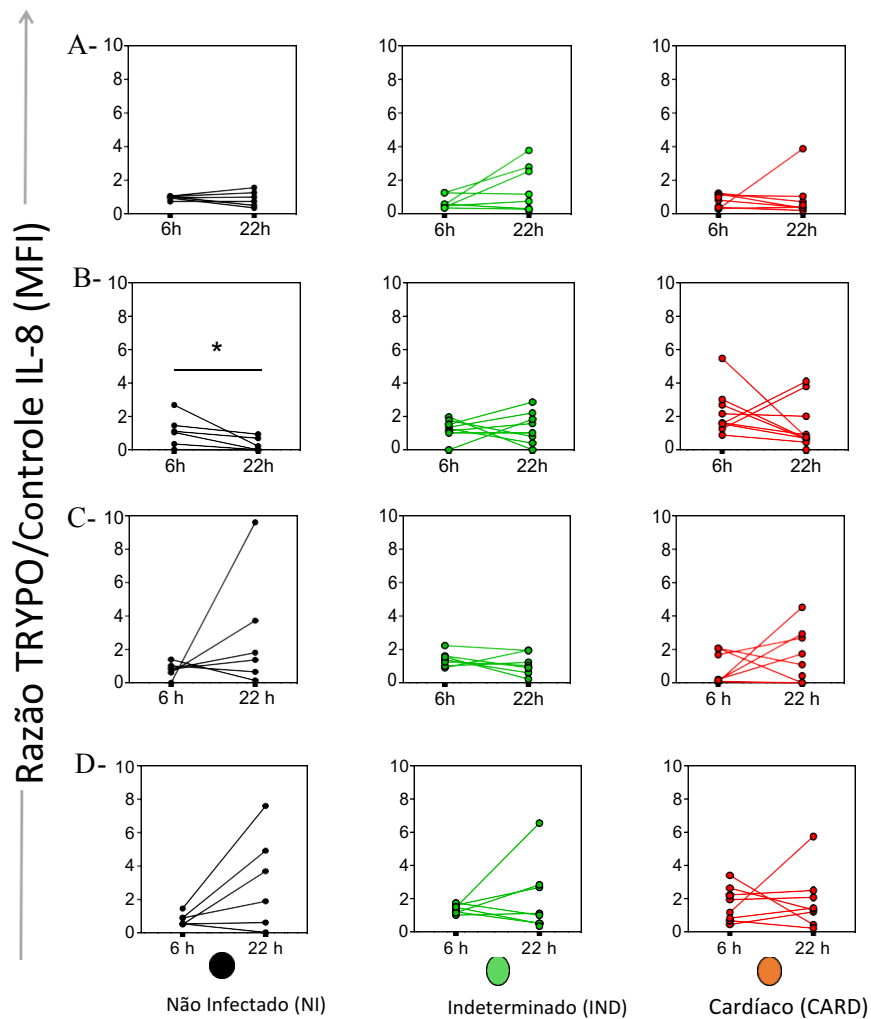


Figura 14. Avaliação da expressão da molécula IL-8. Em neutrófilos (A), Monócitos clássicos (B), Monócitos inflamatórios (C) e Monócitos patrulheiros (D). Os grupos analisados foram indivíduos não infectados (NI, preto, n = 6) e pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada (IND, verde, n = 9) e cardíaca (CARD, vermelho, n = 10), após 6 e 22 horas de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRYPO). A intensidade das moléculas representada pela razão TRYPO/Controle. O gráfico de pontos pareados indicam indivíduos não infectados (NI, preto, n= 6), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND, verde, n= 10) e cardíaca (CARD, vermelho, n=9). Diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$) detectadas pelo teste dos pontos pareados de Wilcoxon foram indicadas por linhas e asterisco (*).

Considerando a expressão de IL-10, os monócitos clássicos de NI e inflamatórios de IND demonstram um aumento significativo dessa citocina após cultura de 22 horas (Figura15 B). Nas demais subpopulações celulares não se observou diferenças significativas entre os tempos nos grupos avaliados (Figura 15 A-C-D).

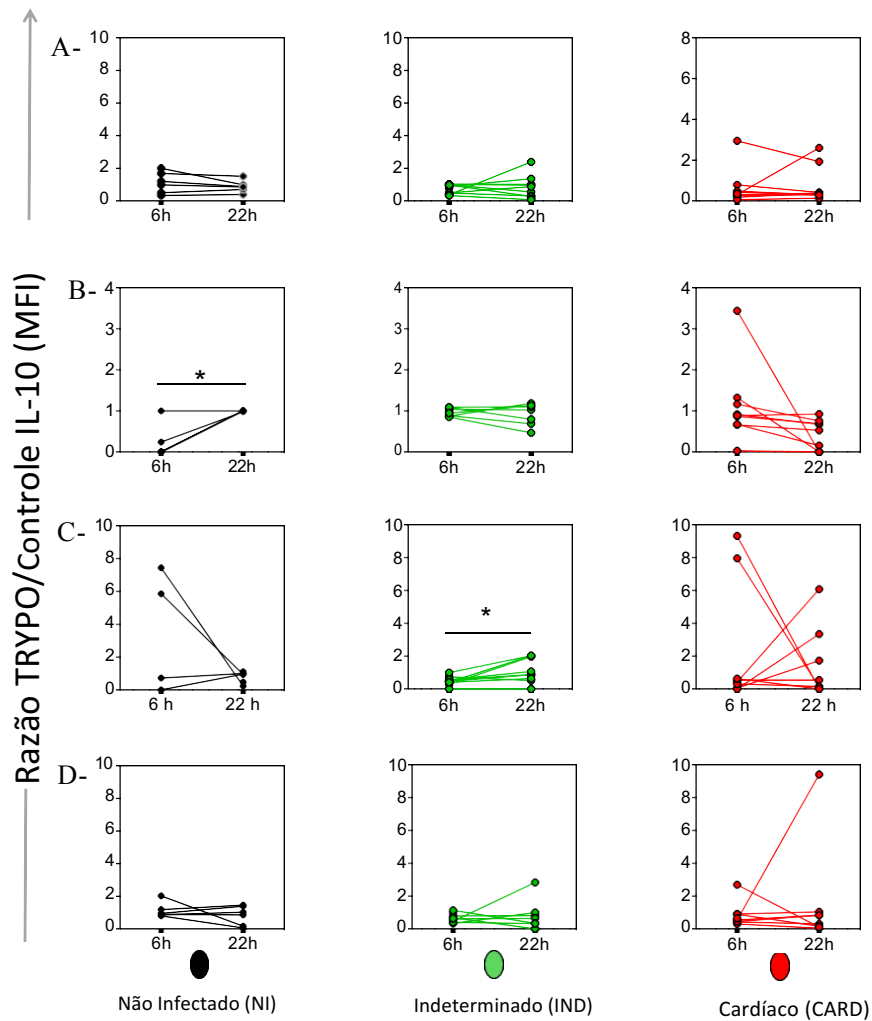


Figura 15. Avaliação da expressão da molécula IL-10. Em neutrófilos (A), Monócitos clássicos (B), Monócitos inflamatórios (C) e Monócitos patrulheiros (D). Os grupos analisados foram indivíduos não infectados (NI, preto, n = 6) e pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada (IND, verde, n = 9) e cardíaca (CARD, vermelho, n = 10), após 6 e 22 horas de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRYPO). A intensidade das moléculas representada pela razão TRYPO/Controle. O gráfico de pontos pareados indicam indivíduos não infectados (NI, preto, n= 6), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND, verde, n= 10) e cardíaca (CARD, vermelho, n=9). Diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$) detectadas pelo teste dos pontos pareados de Wilcoxon foram indicadas por linhas e asterisco (*).

Os dados na figura 17 estão representados pela intensidade média da molécula IL-12 através da razão TRYPO/Controle. A análise dos dados indica uma redução significativa na expressão de IL-12 nos monócitos clássicos dos pacientes IND e CARD na cultura de 22 horas (Figura 16 B). Quando observamos neutrófilos e monócitos inflamatórios e patrulheiros diferenças estatísticas não foram observadas entre os tempos nos grupos avaliados (Figura 16 A-C-D).

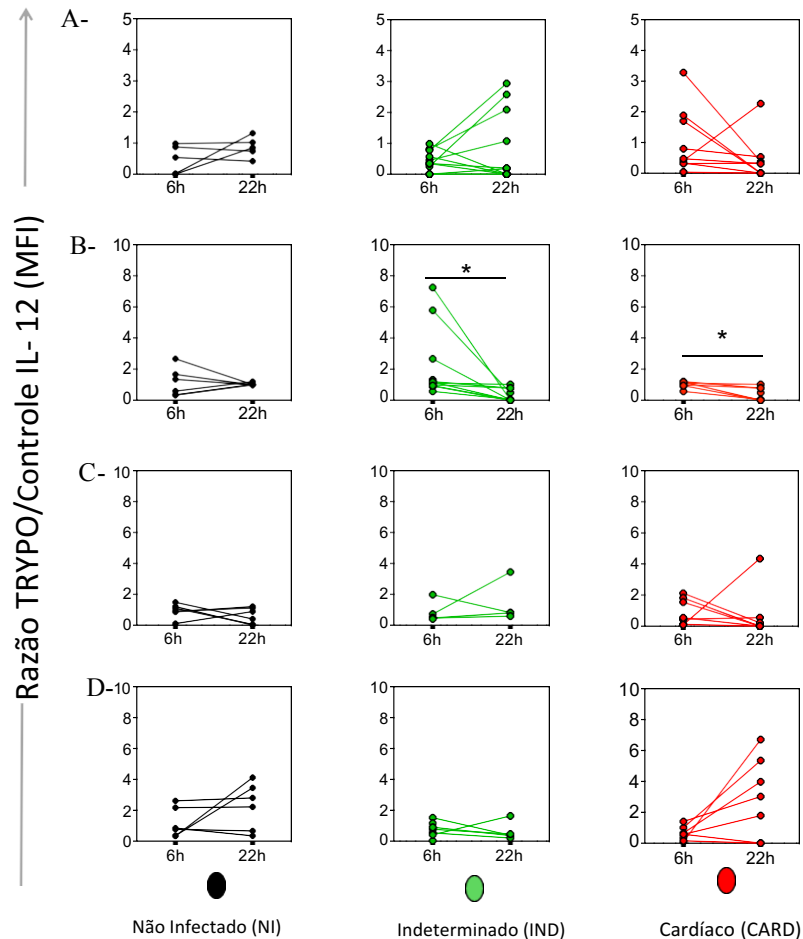


Figura 16. Avaliação da expressão da molécula IL-12. Em neutrófilos (A), Monócitos clássicos (B), Monócitos inflamatórios (C) e Monócitos patrulheiros (D). Os grupos analisados foram indivíduos não infectados (NI, preto, n = 6) e pacientes com doença de Chagas apresentando as formas clínicas indeterminada (IND, verde, n = 9) e cardíaca (CARD, vermelho, n = 10), após 6 e 22 horas de estímulo com antígenos do *T. cruzi* (TRYPO). A intensidade das moléculas representada pela razão TRYPO/Controle. O gráfico de pontos pareados indicam indivíduos não infectados (NI, preto, n= 6), pacientes com a forma clínica indeterminada (IND, verde, n= 10) e cardíaca (CARD, vermelho, n=9). Diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0.05$) detectadas pelo teste dos pontos pareados de Wilcoxon foram indicadas por linhas e asterisco (*).

5 DISCUSSÃO

A resistência ao *T. cruzi* observada em humanos e em modelos experimentais é, em parte, devido à resposta imune celular, responsável pela produção de citocinas, quimiocinas e intermediários de oxigênio e nitrogênio (Campos *et al.*, 2001).

Já é de conhecimento que os neutrófilos estão entre as primeiras células a serem recrutadas para o local da infecção e são importantes no controle da defesa do hospedeiro através de mecanismos oxidantes e protease-dependentes, além de fornecerem uma ligação importante entre a imunidade inata e adaptativa durante infecções parasitárias (Faurichou e Borregaard, 2003; Appelberg, 2007). Apesar da importância dos neutrófilos no controle da infecção por diferentes parasitos (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004; Abi Abdallah e Denkers, 2012), pouco se sabe sobre o papel dessas células na infecção humana pelo *T. cruzi*. Demonstrou-se que os neutrófilos podem destruir formas intracelulares do parasito (Molina e Kierszenbaum, 1989). No entanto, os neutrófilos ativados têm uma vida útil curta e sofrem apoptose constitutiva, levando à sua remoção fagocítica por macrófagos (Savill, 1997). Essa população celular vem ganhando certa notoriedade no contexto da doença de Chagas (Luna-Gomes *et al.*, 2014), observaram *in vitro* que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos pode suprimir a inflamação, favorecendo a replicação intracelular de parasitas através da liberação de mediadores anti-inflamatórios.

Nossos dados não revelaram diferenças significativas nos neutrófilos, entretanto os diferentes ciclos de vidas dos parasitos intracelulares são cruciais para os efeitos exercidos sobre o hospedeiro principalmente nas vias apoptóticas. Os protozoários dependem das células dos hospedeiros intactas para se reproduzir, incluindo *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*, que usam mecanismos evoluídos para suprimir ou atrasar a apoptose em células hospedeiras infectadas (Schaumburg *et al.*, 2006). Também avaliamos a frequência das subpopulações de monócitos, e observamos reduções significativas em monócitos inflamatórios, dos grupos NI e CARD. Foi descrito que a presença dos monócitos clássicos e inflamatórios nos casos de cardiopatia chagásica (Thomas *et al.*, 2015).

Poucos trabalhos mostram atividade das subpopulações de monócitos na doença de Chagas (Magalhães *et al.*, 2015; Pinto, Medeiros, Teixeira-Carvalho, *et al.*,

2018; Medeiros *et al.*, 2019). A infecção por *T. cruzi* induz uma ativação constante do sistema imune do hospedeiro, sinais inflamatórios são exacerbados, possivelmente levando a alterações nas frequências de subpopulações de monócitos (Pérez-Mazliah *et al.*, 2018). Nossos achados sugerem que pacientes sem sinais de disfunção cardíaca ou doença cardíaca leve têm um perfil de monócitos mais equilibrado, com capacidade de reparo tecidual pró-inflamatório e anti-inflamatório.

Recentemente, (Pérez-Mazliah *et al.*, 2018) demonstrou que o perfil de pacientes menos graves da doença de Chagas é composto por monócitos patrulheiros, indo de encontro com os achados desse trabalho. Sugerimos que exista uma maior presença dessas subpopulações transacionando no momento em que exista a modulação para a resposta equilibrada nos pacientes IND. Observamos, também, uma maior frequência de monócitos clássicos. Esses dados revelam que o aumento de monócitos clássicos em pacientes não infectados pode ser uma condição fisiológica normal, encontrada em indivíduos saudáveis, sugerindo que indivíduos doentes podem apresentar um aumento desses monócitos clássicos durante a fase aguda, para contribuir com o aumento da fagocitose e capacidade de eliminação do parasito (Pinto, Medeiros, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2018).

Nossos dados para os receptores toll, de forma geral, indicam uma menor expressão dos receptores tipo toll 2 e 4 nos grupos pacientes CARD em neutrófilos e monócitos inflamatórios, nas culturas após 22 horas. Já foi demonstrado a importância dos receptores Toll em diversas outras doenças como malária (Gowda, 2007), leishmaniose (Faria *et al.*, 2012), toxoplasmose (Yarovinsky, 2008). O receptor TLR desempenha papel na internalização do parasito através da fagocitose, e induz a resposta imune para reduzir a replicação do parasito a partir de células do sistema imune.

Os TLR-2 e 4, são cruciais para os momentos iniciais da infecção (Gravina *et al.*, 2013). Diferenças na expressão ou ativação desses receptores, podem ser responsáveis pelo perfil predominante de citocinas pró-inflamatórias ou regulatórias apresentado por pacientes com forma sintomática ou indeterminada (Mendes Da Silva *et al.*, 2017). Embora os neutrófilos e monócitos apresentem uma capacidade fagocitária semelhante (Silva e Correia-Neves, 2012), sabe-se que a expressão de TLR-2, é maior nos monócitos (Kurt-Jones *et al.*, 2002). Esta diferença na expressão de Toll-2 pode ser responsável pela menor intensidade de infecção de neutrófilos, desde a sua ativação até estar relacionada com a internalização de *T. cruzi* (Aoki *et al.*, 2012).

A expressão TLR-4 é considerada crítica no controle de parasitos durante a fase aguda. Tem sido demonstrado que a sinalização TLR-4 desencadeia um evento importante parasiticida precoce contra *T. cruzi*. Outro dado reportado recentemente acerca do TLR-4 sugere uma maior capacidade de reconhecimento de antígenos após estímulos *in vitro* nos pacientes IND e CARD nas primeiras horas de cultura (Medeiros *et al.*, 2019). Essa redução dos receptores pode ser justificada pelo tempo de exposição ao TRYPO, visto que os TLR atuam para estimular o início da resposta imune, servindo como elo entre a imunidade inata e adquirida, podendo, com o passar do tempo, reduzir sua expressão e conseqüentemente sua inteiração com o antígeno. De forma complementar Sousa-Rocha *et al.* (2007), demonstraram que tripomastigotas e antígenos solúveis de *T. cruzi* são capazes de induzir liberação de NET's em neutrófilos humanos pela ativação de TLR2 e 4, e que esta resposta depende da ativação do “burst” respiratório e da produção de espécies reativas de oxigênio. Essas NET's não possuem capacidade tripanocida, pois não afetam a viabilidade do parasito, mas são capazes de reduzir sua infectividade induzindo tripomastigotas a diferenciarem-se em amastigotas no ambiente extracelular.

(Medeiros *et al.*, 2019) demonstraram que neutrófilos de pacientes IND e CARD expressam menos HLA-DR e por isso podem ter a o aumento da expressão de HLA-DR nos monócitos intermediários e patrulheiros nos indivíduos NI pode estar relacionado com a maior capacidade fagocítica para tentar impedir a progressão da doença, já os patrulheiros podem estar tentando reduzir os danos nos tecidos.

Estudos sugerem Souza *et al.*, (2004); Soares *et al.*, (2016),o envolvimento dos monócitos totais na doença de Chagas nesses foi observado uma maior expressão da molécula CD80 em indivíduos NI, IND e CARD após exposição com parasitos de *T. cruzi* vivos e com antígenos flagelares. Entretanto, as subpopulações de monócitos atuando na doença de Chagas permanecem obscuras. Nossos dados revelam um aumento na expressão de CD80 nos monócitos inflamatórios e patrulheiros do grupo IND, após 22 horas. CD80, parece ser essencial para a ativação dos linfócitos após inteiração com o receptor CD28 em pacientes com doença de Chagas, independente da forma clinica (Pinto, Medeiros, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2018). Ainda sobre as moléculas de co-estimulação, estudos anteriores mostraram que a exposição de monócitos ao *T. cruzi* leva a um aumento na expressão de CD80 em monócitos de pacientes IND e CARD (Soares *et al.*, 2016). O aumento de CD80 em monócitos pode ser explicado devido os monócitos clássicos saírem da medula óssea para a corrente sanguínea, onde dão origem a monócitos

intermediários, que posteriormente se diferenciam em monócitos patrulheiros (Yang *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2017).

Recentemente (Pérez-Mazliah *et al.*, 2018) demonstraram que o perfil de pacientes menos graves da doença de Chagas é composto por monócitos patrulheiros, indo de encontro com os achados desse trabalho. O CD86 é mais fortemente expresso em pacientes IND, e o envolvimento de CD86/CTLA-4 pode ser crucial para regular a resposta imune e evitar a inflamação exacerbada em pacientes com a forma IND (Pinto, Medeiros, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2019). Contudo, nossos dados não revelaram diferenças significativas nessa molécula.

Outros estudos sugerem que os indivíduos infectados com *T. cruzi* que apresentam a forma indeterminada da doença crônica têm um perfil modulatório de citocinas produzidas por monócitos, com predominância na produção de IL-10 (Souza *et al.*, 2004; Vitelli-Avelar *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2017). Nossos resultados confirmam a presença da IL-10 em monócitos clássicos e inflamatórios dos grupos NI e IND, após estimulação de 22 horas. Por outro lado, a citocina anti-inflamatória IL-10 parece ser prejudicial na infecção precoce (Roffê *et al.*, 2012). Dados experimentais sugerem que a expressão de citocinas anti-inflamatórias inibe o IFN- γ , diminuindo a atividade tripanocida de macrófagos (Silva *et al.*, 1992). Parece que apenas pacientes assintomáticos regulam a resposta inflamatória pela produção da IL-10, evitando assim a progressão da inflamação (Pinto, Medeiros, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2018).

Ainda avaliando o perfil de citocinas, nossos achados indicaram uma redução da IL-12 no grupo de monócitos clássicos nos pacientes IND e CARD. Sabe-se que a IL-12 desencadeia a expressão de IFN- γ , o que é importante para o controle do *T. cruzi* em modelos experimentais (Gravina *et al.*, 2013). Um estudo sugeriu que os monócitos de pacientes IND e CARD induzem uma resposta inflamatória através da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 por exemplo (Pinto, Medeiros, Teixeira-Carvalho, *et al.*, 2018). Esses resultados corroboram com esses achados, visto que um equilíbrio entre IL-10 e IL-12 foi observado podendo indicar um perfil modulador entre pacientes IND e CARD. Confirmando nossos dados observamos uma redução da IL-8 em monócitos clássicos de indivíduos NI. É de conhecimento que a IL-8 está envolvida no recrutamento de monócitos e neutrófilos e no processo de ativação de sítios de resposta inflamatória aguda (Oliveira *et al.* 2001). Apresentando certa longevidade nesses locais, sendo produzida no início da resposta inflamatória e ativa por um longo período de tempo (Oliveira *et al.* 2001).

Desse modo nossos achados mostram que o tempo pode influenciar a expressão de moléculas que exercem importantes funções na modulação da resposta imune contra o parasito. O estímulo *in vitro* induz maiores diferenças na resposta após 22 horas. Confirmando um perfil mais regulador nos pacientes IND, mas em contrapartida uma menor ativação de receptores de reconhecimentos nos CARD.

6 CONCLUSÃO

A duração da interação *in vitro* de células inatas com antígenos do *T. cruzi* é crucial para a expressão de moléculas de reconhecimento e ativação celulares, especialmente TLR-2, TLR-4, CD80 e HLA-DR. A expressão de moléculas efetoras também parece ser alterada de acordo com o tempo de interação com antígeno. O tempo de cultura induziu uma resposta imune regulatória em células de pacientes IND, com aumento da expressão de IL-10 e CD80. Por outro lado, em células de pacientes CARD, o tempo de cultura diminuiu a expressão de receptores de reconhecimento. Portanto, o tempo de interação entre monócitos e neutrófilos com antígenos de *T. cruzi* influencia a produção de citocinas e a resposta imune reguladora ou inflamatória.

7 ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E
MEDICINA TROPICAL

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533 Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409-9641 FAX: (31) 3409-9642

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos de Pesquisa

TÍTULO:

- Avaliação dos mecanismos imunorreguladores envolvidos no controle da miocardiopatia chagásica.
- Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas.
- Identificação de marcadores imunológicos associados com a disfunção cardíaca na doença de Chagas

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica, e antes de aceitar é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

Descrição da Pesquisa:

OBJETIVOS: O estudo tem como objetivo avaliar os mecanismos imunológicos presentes em pacientes chagásicos, auxiliando na compreensão do aparecimento das lesões e da evolução da doença e, conseqüentemente, no manejo clínico dos pacientes.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Será colhida pequena amostra de sangue (20ml) em tubos estéreis. Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença.

BENEFÍCIOS: Os participantes terão seu estado imunológico avaliado através do hemograma e de outros exames a serem realizados. Além disso, a participação nesse estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença de Chagas, podendo colaborar para a melhoria do tratamento desta doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo.

RISCOS EM POTENCIAL: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da retirada do sangue; no entanto, a

coleta será realizada por profissional de enfermagem treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE): Todas as informações serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

CONFIDENCIALIDADE: Os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, o orientador da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do CPqRR-FIOCRUZ.

DESLIGAMENTO: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

EQUIPE RESPONSÁVEL:

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG)

Coordenadores adjuntos: Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (FIOCRUZ)
Profa. Dra Juliana de Assis Silva Gomes (UFMG)

Colaboradores: Dra Ana Thereza Chaves

Dra Fernanda Fortes

Dra Rafaelle Christine Gomes Fares Dra Ester Roffe Santiago

Ms Giovane Rodrigo de Sousa Nayara Ingrid de Medeiros

Se precisar de maiores informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com Professor Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil 31270-901 ou pelo telefone (0XX) 31-3409 4592, OU NO Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone 31- 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

CONSENTIMENTO: Com base no exposto, estou ciente que a minha participação é voluntária e será restrita à doação de amostras de sangue. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em doença de Chagas do CTR-DIP.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____


Ass. do paciente ou responsável: _____

Ass. da 1ª testemunha: _____

Ass. da 2ª testemunha: _____

Ass. do pesquisador: _____

Anexo B – Carta de aprovação do comitê de ética do IRR

	Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisa René Rachou Comitê de Ética	
<u>CARTA DE APROVAÇÃO Nº 01/2012 – CEP / CPqRR / FIOCRUZ / MS</u>		
Protocolo CEP - CPqRR nº: 15/2011		
Projeto de Pesquisa: "Identificação de marcadores imunológicos associados com a disfunção endócrina na doença de Chagas".		
Pesquisadora Responsável: Juliana do Assis Silva Gomes Estanislau		
Instituição Realizadora: Centro de Pesquisa René Rachou		
Após submissão e análise criteriosa das pendências emitidas no parecer emitido em 27 de setembro de 2011, no Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 196/96-CNS, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.		
Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR / FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições à ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se por a homologação das alterações no projeto de pesquisa proposto.		
Situação: APROVADO.		
Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios parciais e final.		
Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.		
Belo Horizonte, 19 de janeiro de 2012.		
		João Carlos Pinho Dias Coordenador do CPqRR-CPqRR
<small>Av. Augusto de Lima, 1715 - Caixa Postal 32130-002, Belo Horizonte - MG - Brasil Tel.: 51 3241 3265 3566 (atendimento) Fax: 51 3241 3115 http://www.cpqrr.fiocruz.br</small>		

Anexo C – Carta de aprovação do comitê de ética da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0502.0.203.000-11

Interessado(a): Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de novembro de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "**Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABI ABDALLAH, D. S.; DENKERS, E. Y. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. **Front Immunol**, v. 3, p. 382, 2012. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23248631> >.

ACEVEDO, G. R.; GIRARD, M. C.; GÓMEZ, K. A. The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. **Front Immunol**, v. 9, p. 1929, 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30197647> >.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588> >.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077613> >.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 819-23, Oct 2005. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175174> >.

ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by Trypanosoma cruzi of a hemolysin active at low pH. **Mol Biochem Parasitol**, v. 33, n. 3, p. 249-56, Mar 1989. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2468085> >.

AOKI, M. P. et al. Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to Trypanosoma cruzi Infection. **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 737324, 2012. ISSN 2090-0031. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21869919> >.

APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends Microbiol**, v. 15, n. 2, p. 87-92, Feb 2007. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157505> >.

BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. **J Immunol**, v. 177, n. 6, p. 3515-9, Sep 2006. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951309> >.

BARRIAS, E. S.; DE CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. **Front Immunol**, v. 4, p. 186, 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23914186> >.

BARTHOLOMEU, D. C. et al. Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 181, n. 2, p. 1333-44, Jul 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606688> >.

BELGE, K. U. et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. **J Immunol**, v. 168, n. 7, p. 3536-42, Apr 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907116> >.

BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? **Curr Mol Med**, v. 8, n. 6, p. 510-8, Sep 2008. ISSN 1566-5240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18781958> >.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**, v. 27, p. 347-82, 1973. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4201691> >.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782> >.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cell Microbiol**, v. 4, n. 11, p. 701-11, Nov 2002. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427093> >.

BUSCAGLIA, C. A. et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 3, p. 229-36, Mar 2006. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489349> >.

CAMPOS, M. A. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J Immunol**, v. 167, n. 1, p. 416-23, Jul 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418678> >.

_____. Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **J Immunol**, v. 172, n. 3, p. 1711-8, Feb 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734753> >.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Front Immunol**, v. 6, p. 659, 2015. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26834737> >.

CHEN, L. et al. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. **Eur J Immunol**, v. 31, n. 1, p. 265-75, Jan 2001. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11265643> >.

CHIARI, E. et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 22, n. 1, p. 19-23, 1989 Jan-Mar 1989. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2517801> >.

CONNERS, E. E. et al. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. **Acta Trop**, v. 156, p. 68-78, Apr 2016. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26777312> >.

COSTA DE ALBUQUERQUE, M. A. et al. Mortality Trends for Neglected Tropical Diseases in the State of Sergipe, Brazil, 1980-2013. **Infect Dis Poverty**, v. 6, n. 1, p. 20, Feb 2017. ISSN 2049-9957. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28173858> >.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 31-40, Jul 2009. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753455> >.

CROS, J. et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. **Immunity**, v. 33, n. 3, p. 375-86, Sep 2010. ISSN 1097-4180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20832340> >.

DARIO, M. A. et al. Ecological scenario and Trypanosoma cruzi DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). **Parasit Vectors**, v. 9, p. 477, 08 2016. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27580853> >.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 287-92, Jun 2008. ISSN 0951-7375. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448974> >.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 3, p. 283-91, Nov 2010. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599990> >.

FARIA, M. S.; REIS, F. C.; LIMA, A. P. Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 930257, 2012. ISSN 2090-0031. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22523644> >.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1317-27, Nov 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613775> >.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by Trypanosoma cruzi: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 734-47, May 2012. ISSN 1574-6976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22339763> >.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-61, Feb 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133564> >.

GOMES, J. A. et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 7960-6, Dec 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16299288> >.

_____. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1185-93, Mar 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595431> >.

_____. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. **Immunobiology**, v. 217, n. 10, p. 1005-16, Oct 2012. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22387073> >.

GOWDA, D. C. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. **Trends Parasitol**, v. 23, n. 12, p. 596-604, Dec 2007. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17980663> >.

GRAVINA, H. D. et al. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63100, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23650544> >.

HOTEZ, P. J. et al. Control of neglected tropical diseases. **N Engl J Med**, v. 357, n. 10, p. 1018-27, Sep 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804846> >.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Rev Mol Med**, v. 12, p. e29, Sep 2010. ISSN 1462-3994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20840799> >.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat Immunol**, v. 11, n. 5, p. 373-84, May 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404851> >.

KURT-JONES, E. A. et al. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1860-8, Sep 2002. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176910> >.

LANNES-VIEIRA, J. et al. TNF- α and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. **Adv Exp Med Biol**, v. 691, p.

221-30, 2011. ISSN 0065-2598. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153326>>.

LEIBY, D. A. et al. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 2, p. 639-42, Feb 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655360>>.

LINSLEY, P. S. et al. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. **Immunity**, v. 1, n. 9, p. 793-801, Dec 1994. ISSN 1074-7613. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534620>>.

LINSLEY, P. S.; LEDBETTER, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annu Rev Immunol**, v. 11, p. 191-212, 1993. ISSN 0732-0582. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386518>>.

LUNA-GOMES, T. et al. Neutrophils increase or reduce parasite burden in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages, depending on host strain: role of neutrophil elastase. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90582, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24599360>>.

MAGALHÃES, L. M. et al. Differential Activation of Human Monocytes and Lymphocytes by Distinct Strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 7, p. e0003816, 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26147698>>.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 2007. ISSN 1524-4539. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339569>>.

MARTINS, G. A. et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 6, n. 13, p. 1133-44, Nov 2004. ISSN 1286-4579. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488732>>.

MEDEIROS, N. I. et al. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases 2, 9 and Cytokines by Neutrophils and Monocytes in the Clinical Forms of Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 1, p. e0005284, 01 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28118356>>.

_____. Evidence of Different IL-1 β Activation Pathways in Innate Immune Cells From Indeterminate and Cardiac Patients With Chronic Chagas Disease. **Front Immunol**, v. 10, p. 800, 2019. ISSN 1664-3224. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31057540>>.

MENDES DA SILVA, L. D. et al. Participation of TLR2 and TLR4 in Cytokines Production by Patients with Symptomatic and Asymptomatic Chronic Chagas Disease.

Scand J Immunol, v. 85, n. 1, p. 58-65, Jan 2017. ISSN 1365-3083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27783847> >.

MICHAILOWSKY, V. et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol**, v. 159, n. 5, p. 1723-33, Nov 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696433> >.

MIYAHIRA, Y. et al. Critical contribution of CD28-CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun**, v. 71, n. 6, p. 3131-7, Jun 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761091> >.

MOLINA, H. A.; KIERSZENBAUM, F. Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes bystander cardiac cell damage. **Immunology**, v. 66, n. 2, p. 289-95, Feb 1989. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2647628> >.

PASSLICK, B.; FLIEGER, D.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. **Blood**, v. 74, n. 7, p. 2527-34, Nov 1989. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2478233> >.

PATEL, A. A. et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. **J Exp Med**, v. 214, n. 7, p. 1913-1923, Jul 2017. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28606987> >.

PINTO, B. F. et al. The Role of Co-Stimulatory Molecules in Chagas Disease. **Cells**, v. 7, n. 11, Nov 2018. ISSN 2073-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30405039> >.

_____. CD86 Expression by Monocytes Influences an Immunomodulatory Profile in Asymptomatic Patients with Chronic Chagas Disease. **Front Immunol**, v. 9, p. 454, 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29599775> >.

PÉREZ-MAZLIAH, D. E. et al. Distinct monocyte subset phenotypes in patients with different clinical forms of chronic Chagas disease and seronegative dilated cardiomyopathy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 10, p. e0006887, 10 2018. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30346948> >.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 01 2018. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28673423> >.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979> >.

- RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 4454-62, Apr 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034061> >.
- RILEY, J. L. et al. Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 18, p. 11790-5, Sep 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195015> >.
- ROFFÊ, E. et al. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 188, n. 2, p. 649-60, Jan 2012. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156594> >.
- ROPERT, C. et al. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Microbes Infect**, v. 4, n. 9, p. 1015-25, Jul 2002. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106796> >.
- ROTTENBERG, M. E. et al. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect Immun**, v. 61, n. 12, p. 5129-33, Dec 1993. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225589> >.
- SAVILL, J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Br Med Bull**, v. 53, n. 3, p. 491-508, 1997. ISSN 0007-1420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9374033> >.
- SCHAUMBURG, F. et al. Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. **Parasitology**, v. 132 Suppl, p. S69-85, 2006. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018167> >.
- SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop**, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932071> >.
- SHARPE, A. H. Mechanisms of costimulation. **Immunol Rev**, v. 229, n. 1, p. 5-11, May 2009. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426211> >.
- SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 2, p. 116-26, Feb 2002. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910893> >.
- SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p. 169-74, Jan 1992. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730915> >.

SILVA, M. T.; CORREIA-NEVES, M. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. **Front Immunol**, v. 3, p. 174, 2012. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22783254> >.

SOARES, A. K. et al. Expression of co-stimulatory molecules CD80 and CD86 is altered in CD14 + HLA-DR + monocytes from patients with Chagas disease following induction by Trypanosoma cruzi recombinant antigens. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 5, p. 632-636, 2016 Sep-Oct 2016. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27812661> >.

SOUZA, P. E. et al. Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 75, n. 4, p. 1886-94, Apr 2007. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283096> >.

_____. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5283-91, Sep 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15322024> >.

STAHL, P. et al. Trypomastigotes and amastigotes of Trypanosoma cruzi induce apoptosis and STAT3 activation in cardiomyocytes in vitro. **Apoptosis**, v. 18, n. 6, p. 653-63, Jun 2013. ISSN 1573-675X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435997> >.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. **Glob Heart**, v. 10, n. 3, p. 139-44, Sep 2015. ISSN 2211-8179. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26407508> >.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-20, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303872> >.

TARDIEUX, I. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117-30, Dec 1992. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1473148> >.

TECCHIO, C.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. **Front Immunol**, v. 5, p. 508, 2014. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374568> >.

THOMAS, G. et al. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 35, n. 6, p. 1306-16, Jun 2015. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838429> >.

THOMPSON, C. B. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? **Cell**, v. 81, n. 7, p. 979-82, Jun 1995. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541314> >.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clin Exp Immunol**, v. 145, n. 1, p. 81-92, Jul 2006. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16792677> >.

_____. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scand J Immunol**, v. 68, n. 5, p. 516-25, Nov 2008. ISSN 1365-3083. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18803607> >.

WONG, K. L. et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. **Blood**, v. 118, n. 5, p. e16-31, Aug 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21653326> >.

XIONG, H.; PAMER, E. G. Monocytes and infection: modulator, messenger and effector. **Immunobiology**, v. 220, n. 2, p. 210-4, Feb 2015. ISSN 1878-3279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25214476> >.

YANG, J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomark Res**, v. 2, n. 1, p. 1, Jan 2014. ISSN 2050-7771. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24398220> >.

YAROVINSKY, F. Toll-like receptors and their role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. **Immunol Lett**, v. 119, n. 1-2, p. 17-21, Aug 2008. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617274> >.