

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:**

**INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

**Giovane Rodrigo de Sousa**

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS E  
SUA ASSOCIAÇÃO COM A IMUNOPATOGENIA  
DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA**

**Belo Horizonte**

**2016**

**Giovane Rodrigo de Sousa**

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS E  
SUA ASSOCIAÇÃO COM A IMUNOPATOGENIA  
DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau.

**Belo Horizonte**

**2016**

Sousa, Giovane Rodrigo de.  
S725e Expressão de citocinas e quimiocinas e sua associação com a imunopatogenia da cardiopatia chagásica crônica [manuscrito]. / Giovane Rodrigo de Sousa. - - Belo Horizonte: 2016.  
142f.: il.  
Orientador: Manoel Otávio da Costa Rocha.  
Coorientador: Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Doença de Chagas. 2. Citocinas. 3. Citometria de Fluxo. 4. Morbidade. 5. Marcadores Biológicos. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Rocha, Manoel Otávio da Costa. II. Estanislau, Juliana de Assis Silva Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WC 705

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

## **REITOR**

Prof. Jaime Arturo Ramírez

## **VICE-REITORA**

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

## **PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

**PRÓ-REITOR DE PESQUISA:** Profa. Adelina Martha dos Reis

## **FACULDADE DE MEDICINA**

### **DIRETOR**

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

### **VICE-DIRETOR**

Prof. Humberto José Alves

### **COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Profa. Sandhi Maria Barreto

### **SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Profa. Ana Cristina Côrtes Gama

### **CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

Prof. Unaí Tupinambás

### **COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:**

#### **INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

### **SUBCOORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA**

#### **SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Profa. Maria do Carmo Pereira Nunes (Titular)

Prof. Enio Roberto Pietra Pedroso (Suplente)

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior (Titular)

Prof<sup>ª</sup>. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (Suplente)

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro (Titular)

Prof. Ricardo Toshio Fujiwara (Suplente)

Prof<sup>ª</sup>. Denise Utsch Gonçalves (Titular)

Prof<sup>ª</sup>. Silvana Spíndola de Miranda (Suplente)

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho (Titular)

Prof<sup>ª</sup>. Fabiana Simão Machado (Suplente)

Prof. Unaí Tupinambás (Titular)

Prof<sup>ª</sup>. Mariangela Carneiro (Suplente)

Lourena Emanuele Costa (Representante discente titular)

Pollyana Anício Magalhães Gontijo (Representante discente suplente)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E  
MEDICINA TROPICAL

**UFMG**

## **ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO GIOVANE RODRIGO DE SOUSA**

Realizou-se, no dia 01 de março de 2016, às 14:00 horas, Sala 018 - andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 140ª defesa de tese, intitulada "*Expressão de citocinas e quimiocinas e sua associação com a imunopatogenia da Cardiopatia Chagásica Crônica*", apresentada por GIOVANE RODRIGO DE SOUSA, número de registro 2013708194, graduado no curso de ENFERMAGEM, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha - Orientador (UFMG), Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (UFMG), Profa. Andrea Teixeira de Carvalho (Fiocruz), Prof. Renato Sathler Avelar (Newton Paiva), Profa. Cristiane Alves da Silva Menezes (UFMG) e Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

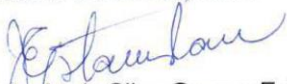
Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 01 de março de 2016.

  
Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha

  
Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

  
Profa. Andrea Teixeira de Carvalho

  
Prof. Renato Sathler Avelar

  
Profa. Cristiane Alves da Silva Menezes

  
Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**“Expressão de citocinas e quimiocinas e sua associação com a imunopatogenia da Cardiopatia Chagásica Crônica”**

**GIOVANE RODRIGO DE SOUSA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

Aprovada em 01 de março de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha - Orientador  
UFMG

Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau  
UFMG

Profa. Andrea Teixeira de Carvalho  
Fiocruz

Prof. Renato Sattler Avelar  
Newton Paiva

Profa. Cristiane Alves da Silva Menezes  
UFMG

Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier  
UFMG

Belo Horizonte, 1 de março de 2016.

## APOIO FINANCEIRO



Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ-02601-10, APQ-04129-10 e PPM-00501-13) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 475497/2007-4, 403592/2008-9, 478846/2009-6, 407692/2012-6, 308219/2012-0 e 404151/2012-4).



*A Rafaella, minha esposa, e  
aos meus filhos Benício e Lorenzo,  
por me ensinar a ter as mais legítimas  
ambições: lutar pela vida e ser feliz.*

*Meu amor por vocês vai até  
o limite do meu entendimento.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, fonte diária do meu sustento espiritual, por me emprestar o coração e o oxigênio que respiro e por me levar a encontrar Sua assinatura na existência humana.

Aos meus pais, Admar e Leníria, por me deixar como maior patrimônio valores como a honestidade e o exemplo de conduta moral.

À minha esposa, Rafaella, pelo amor, tolerância e compreensão incondicionais. O seu apoio foi fundamental. Esteja certa de que participa desta conquista, como agente, e não como testemunha.

Aos meus filhos, Benício e Lorenzo, pela alegria contagiante, bálsamo da minha caminhada. Eu sempre acreditei na lógica que leva à razão, mas com o tempo descobri que é no amor que qualquer uma delas pode ser encontrada. Vocês são todas as minhas razões.

Aos meus irmãos, pelo carinho, incentivo e vibração dedicados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, UFMG, por contribuir para o desenvolvimento da disciplina intelectual, da criatividade, do espírito de cooperação e de trabalho em grupo. Orgulho-me por ter sido formado neste Programa.

Ao meu orientador, Professor Manoel Otávio, por estimular-me a reflexão, a crítica, a curiosidade, a renúncia à ignorância científica e por marcar profundamente a minha vida acadêmica. O meu eterno respeito, admiração e gratidão.

À minha coorientadora, Professora Juliana, pela autonomia que me foi dispensada durante a consecução deste trabalho.

Ao Doutor Rodrigo Corrêa Oliveira, pela oportunidade de aperfeiçoamento técnico no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR).

À Professora Maria do Carmo, pelo apoio, incentivo e alegria com cada conquista.

Ao Professor Antônio Ribeiro, pelos ensinamentos sobre delineamento da pesquisa clínica e pela habitual e gentil atenção.

Ao amigo e parceiro Marcos Damasio, que, mesmo em outro continente desenvolvendo ciência básica em imunologia, nunca recuou diante dos desafios e da cooperação na pesquisa translacional, o meu sincero obrigado.

À Jussara, secretária deste Programa de Pós-graduação, pelo carinho, pela escuta atenciosa, pela prontidão e competência nos encaminhamentos administrativos.

Aos funcionários do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) Orestes Diniz e do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do CPqRR, pela prazerosa convivência.

À equipe da Plataforma de Citometria de Fluxo do CPqRR, pelo suporte técnico durante os procedimentos.

Aos meus professores e aos pacientes, que em tantos momentos marcantes da minha vida, me ajudaram a crescer e a me tornar uma pessoa melhor, minha gratidão.

*“Sou o resultado do que uma  
grande mulher quis fazer de mim.”*

*Thomas Edison*

## RESUMO

Citocinas e quimiocinas exercem papel importante na modulação da resposta imune. Contudo, desconhece-se a existência, ou não, de um padrão uniforme de expressão de citocinas e quimiocinas na doença de Chagas e se este constituiria uma característica individual do paciente ou de grupo de pacientes com grau semelhante de morbidade. Este estudo foi planejado para identificar um conjunto de biomarcadores associados com a morbidade e investigar o perfil de expressão de citocinas e quimiocinas no curso médio da infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). O estudo pode ser considerado uma das mais amplas análises envolvendo amostra significativa de pacientes com forma indeterminada (IND, n=93) e cardiomiopatia dilatada (CARD, n=141). Indivíduos saudáveis (n=32) foram incluídos como grupo controle (não infectados [NI]). A média de idade dos pacientes foi de 46.83±9.97 (23 a 69 anos) e 119 (51%) eram do sexo masculino. O grupo IND apresentou níveis substancialmente mais elevados de IL-17, quando comparado ao grupo NI e CARD. Além disso, verificou-se correlação significativa entre altos níveis de IL-17 e melhor função ventricular esquerda. Análise exploratória de rede de citocinas e quimiocinas no grupo CARD evidenciou correlações positivas e significativas entre IFN- $\gamma$   $\leftrightarrow$  CXCL10 e CXCL9  $\leftrightarrow$  CXCL10, assim como correlações fortes e inversas envolvendo IL-10 com CXCL9 e TNF- $\alpha$ . No entanto, no grupo IND, observou-se uma rede com fortes conexões ao longo dos eixos IL-10  $\leftrightarrow$  IL-17, e IL-10  $\leftrightarrow$  IFN- $\gamma$ , quando comparado aos outros grupos. Análises adicionais mostraram que níveis elevados de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CXCL9, e CXCL10 associados a níveis reduzidos de IL-10 e IL-17 associam-se com maior morbidade cardíaca na doença de Chagas. O ensaio de algoritmo de aprendizado de máquina indicou IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, e IL-17 como fortes candidatos à biomarcadores de morbidade e prognóstico na doença de Chagas. Nenhum padrão de expressão de IL-10 e IFN- $\gamma$  foi observado no grupo IND. Por outro lado, essas citocinas exibiram perfil uniformel no grupo CARD. As evidências deste estudo revelam a existência de um perfil regular de expressão de citocinas e quimiocinas ao longo da infecção crônica pelo *T. cruzi* e sua associação com a morbidade na doença de Chagas. As citocinas IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e as quimiocinas CXCL9 e CXCL10, em conjunto, podem representar importantes biomarcadores de morbidade e prognóstico na cardiopatia chagásica crônica.

Palavras-chave: Citocinas. Quimiocinas. Resposta imune. Citometria de fluxo. Doença de Chagas. Morbidade.

## ABSTRACT

Cytokines and chemokines play an important role in modulating immune response; however, their patterns of expression in short, medium, and long-terms throughout the chronic phase of Chagas disease (ChD) have never been elucidated. This study was designed to identify a composite set of biomarkers associated with morbidity and to investigate the pattern of cytokine and chemokine expression in ChD. It is one of the largest analyses involving large set of samples from a cohort of patients grouped as indeterminate form (IND, n=93) and Chagas cardiomyopathy (CARD, n=141). Healthy individuals (n=32) were also included as a control group (non-infected [NI]). Mean age of ChD patients was  $46.83 \pm 9.97$  years (range, 23-69 years), and 119 (51%) were male. The IND group presented substantially higher levels of IL-17 compared to the CARD group and the NI group. Moreover, a significant correlation was verified between lower levels of IL-17 and cardiac morbidity. Exploratory analysis of cytokine and chemokine networks in the CARD group revealed significant positive correlations amongst IFN- $\gamma$   $\leftrightarrow$  CXCL10 and CXCL9  $\leftrightarrow$  CXCL10 as well as negative strong axes connecting IL-10 with CXCL9 and TNF- $\alpha$ . By contrast, in the IND group was remarkable the presence of an overall multifaceted network with stronger connections between IL-10 and IL-17, and IL-10 and IFN- $\gamma$  axes along when compared to the other groups. Additional analyses showed that higher levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CXCL9, and CXCL10 together with lower levels of IL-10 are also associated with worse left ventricular function in ChD. The machine learning algorithms assays pointed out IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, and IL-17 as putative immunological biomarkers in chronic ChD. No pattern could be observed when evaluating the IL-10 and IFN- $\gamma$  expression in the IND group. On the other hand, these cytokines proved to be uniform in the CARD group. All together, this study revealed a regular pattern of cytokine and chemokine expression throughout the chronic infection with *T. cruzi* and also their association with morbidity in ChD. The cytokines IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ , as well as the chemokines CXCL9 and CXCL10 together may represent important immunological biomarkers of morbidity and prognosis in chronic ChD.

Key words: Cytokines. Chemokines. Immune system. Flow cytometry. Chagas disease. Chagas cardiomyopathy. Morbidity.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APC	Alofocianina
AV	Átrio-ventricular
AVE	Acidente vascular encefálico
BAV	Bloqueio átrio-ventricular
BAVT	Bloqueio átrio-ventricular total
BCRD	Bloqueio completo de ramo direito
BCRE	Bloqueio completo de ramo esquerdo
CARD	Cardiomiopatia dilatada
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL2	Proteína inflamatória macrofágica
CCL5	RANTES
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
CXCL8	Interleucina 8
CXCL9	Monocina induzida pelo interferon gama (IFN-γ)
CXCL10	Proteína 10 induzida pelo interferon
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DIP-HC	Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas
ECG	Eletrocardiograma
E/e'	Relação E/e'
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCI	Forma crônica indeterminada
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz

FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FSC	<i>FowardScatter</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HBAE	Hemibloqueio anterior esquerdo
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IND	Forma indeterminada
IV	Intraventricular
LASER	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LICM	Laboratório de Imunologia Celular e Molécula
LSM	Meio de separação de linfócitos
MIF	Intensidade média de fluorescência
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MW	Mann-Whitney
NBR	Norma brasileira
NI	Indivíduo saudável não infectado
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
°C	Graus centígrados
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salínico
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína clorofila piridinina
pg/mL	Picograma por mililitro
rpm	Rotações por minuto
SSC	<i>Sidescatter</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>



T4	Tiroxina
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF	Fator transformador de crescimento
Th	<i>T-helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEd	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras

FIGURA 1 - Família de receptores de IL-17, interação com os ligantes e suas principais características estruturais.....	39
FIGURA 2 - Expressão dos receptores de quimiocinas nos diferentes tipos celulares e seus ligantes.....	43
FIGURA 3 - Modelo representativo de secreção da quimiocina CCL2.....	45
FIGURA 4 - Modelo representativo de secreção da quimiocina CXCL9.....	49
FIGURA 5 - Modelo representativo de secreção da quimiocina CXCL10.....	50

### Quadros

QUADRO 1 - Classificação clínica da cardiopatia chagásica crônica.....	57
QUADRO 2 - Descrição das variáveis do estudo, 2016.....	62

## LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Distribuição da população e amostra estimada, 2016.....	61
--	----

# SUMÁRIO<sup>1</sup>

APRESENTAÇÃO.....	22
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	23
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 Cardiopatia chagásica crônica.....	26
2.2 Imunopatogenia da cardiopatia chagásica crônica.....	29
2.3 Interleucina 17.....	35
2.4 Quimiocinas e seus receptores.....	40
2.4.1 Quimiocina CCL2, CXCL9 e CXCL10.....	44
2.5 Ecocardiografia na doença de Chagas.....	50
3 HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	54
3.1 Hipóteses.....	54
3.2 Objetivo geral.....	54
3.3 Objetivos específicos.....	54
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	55
4.1 Delineamento do estudo.....	55
4.2 Descrição do local.....	55
4.3 Caracterização geral da população estudada.....	56
4.4 Critérios de elegibilidade.....	58
4.4.1 Critérios de inclusão.....	58
4.4.2 Critérios de exclusão.....	59

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011 utilizando-se o *software EndNote X7 17.0.1*.

4.5 Cálculo do tamanho amostral.....	60
4.6 Definição das variáveis do estudo.....	61
4.7 Avaliação clínica.....	63
4.8 Eletrocardiograma.....	63
4.9 Ecocardiograma.....	63
4.10 Separação do plasma do sangue periférico.....	65
4.11 Quantificação dos níveis plasmáticos das citocinas IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ e IL-12, e das quimiocinas CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5 e CXCL8.....	65
4.12 Análise de bioinformática.....	67
4.13 Análise estatística.....	67
4.14 Considerações éticas.....	68
4.15 Pesquisa bibliográfica.....	69
5 RESULTADOS.....	71
5.1 Manuscrito I.....	71
5.2 Manuscrito II.....	88
6 CONCLUSÕES.....	113
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	114
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	115
9 PERSPECTIVAS.....	116
REFERÊNCIAS.....	117

## APRESENTAÇÃO

Este trabalho foi estruturado conforme a Resolução nº. 02/2013 de 18 de setembro de 2013, que regulamenta o formato dos trabalhos finais e de qualificação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, da seguinte forma:

### **Parte I**

Considerações Iniciais

Introdução

Revisão da Literatura

Objetivos

Metodologia

### **Parte II**

Resultados e Discussão

Manuscrito I: *The role of interleukin 17-mediated immune response in Chagas disease: high level is correlated with better left ventricular function (PloS One)*

Manuscrito II: *Pattern of cytokine and chemokine expression throughout the chronic phase of Chagas disease (Euro J Heart Failure)*

### **Parte III**

Conclusões

Considerações Finais

Limitações do Estudo

Perspectivas

Referências

Anexos e Apêndices

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os estudos que integram este trabalho constituem parte da linha de pesquisa “Fatores determinantes de prognóstico e morbidade na cardiopatia chagásica crônica” do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, coordenada pelo Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha. Todos os sujeitos da pesquisa foram atendidos no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas no Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias, convênio SUS/UFMG, também sob responsabilidade ética e assistencial do seu coordenador.

A expectativa é que este estudo esclareça aspectos importantes dos fatores e mecanismos associados com a morbidade da cardiopatia chagásica crônica. A definição de marcadores não invasivos para pior prognóstico poderá possibilitar a identificação de subgrupos de pacientes que mereçam atenção especial, adotando-se condutas médico-trabalhistas e terapêuticas específicas, visando prevenir ou retardar a evolução clínica desfavorável desses pacientes.

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada. Decorridos mais de cem anos de seu descobrimento, persiste ainda como um dos principais problemas de saúde pública na América Latina, estando intimamente associada ao subdesenvolvimento social e econômico. Estima-se que seis a sete milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2015). A Organização Mundial de Saúde estima ainda cerca de 56 mil novos casos anuais da doença de Chagas (Salvatella *et al.*, 2013). Dentre as pessoas infectadas, cerca de 30% apresentam alguma manifestação clínica de acometimento cardíaco (Mady *et al.*, 1994; Rocha *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2013). Regionalmente, a doença constitui a maior causa de incapacidade em adultos jovens, em decorrência de doenças tropicais (Cubillos-Garzon *et al.*, 2004). Apesar de esforços para combater a transmissão vetorial e sanguínea em países endêmicos, a globalização tem levado a doença de Chagas a se tornar um problema de saúde em países que não estão preparados para diagnosticá-la ou tratá-la (Schmunis e Yadon, 2010).

A expressão clínica da doença de Chagas e seu prognóstico resultam de fatores múltiplos e complexos ligados ao parasito, ao hospedeiro e a modalidade de interação entre eles. Os mecanismos patogénéticos envolvidos no desenvolvimento das formas clínicas da doença são ainda pouco compreendidos, sendo que a forma de expressão da resposta imunológica, resultante da interação parasito-hospedeiro, exerce papel fundamental neste contexto.

Não se encontra completamente definido se o perfil da resposta imune caracterizada pela produção de citocinas e quimiocinas teria associação com o grau de acometimento orgânico e funcional cardíaco da doença de Chagas em suas modalidades polares - a forma crônica indeterminada e a cardiomiopatia dilatada. Desconhece-se também a existência, ou não, de um padrão uniforme de expressão



de citocinas e quimiocinas e se este constituiria uma característica individual ou de grupos de pacientes com grau semelhante de morbidade. O conhecimento de haver ou não um perfil uniforme na produção de citocinas e quimiocinas é importante, pois isso possibilita caracterizar o padrão de resposta imune por meio de uma ou poucas dosagens plasmáticas.

Os estudos propostos, neste trabalho, visaram verificar a relação da resposta imune, expressa pelos níveis plasmáticos de citocina e de quimiocinas, com o grau de morbidade em pacientes com formas polares da doença de Chagas: forma crônica indeterminada (IND) e cardiomiopatia dilatada (CARD).

A compreensão do padrão da resposta imune e sua associação com morbidade são elementos potencialmente importantes para estratificação de risco, assim como para a abordagem clínica, prevenção e tratamento precoce e adequado dos pacientes com doença de Chagas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Cardiopatia chagásica crônica

A cardiopatia crônica constitui a manifestação clínica mais importante da doença de Chagas, constituindo elemento determinante principal da incapacidade laborativa e do prognóstico dos pacientes acometidos por essa enfermidade (Coura *et al.*, 1985; Bestetti e Muccillo, 1997). Sua importância médico-social é salientada pelo fato de acometer indivíduos em etapas produtivas de suas vidas, além de cursar com pior prognóstico, quando comparadas com cardiopatias de outras etiologias (Bestetti e Muccillo, 1997; Freitas *et al.*, 2005; Dias, 2007). Os mecanismos intrínsecos e peculiares a cada paciente que determinam seu padrão evolutivo ainda não foram completamente desvendados.

As evidências clínicas de lesão cardíaca surgem anos ou décadas após a infecção pelo *T. cruzi*. A maior parte dos pacientes acometidos pela cardiopatia chagásica encontra-se entre a segunda e a quarta décadas de vida (Dias *et al.*, 1945).

A cardiopatia chagásica crônica tem como substrato morfológico fundamental uma inflamação progressiva e fibrosante do miocárdio (Bogliolo, 1976). O acúmulo progressivo de colágeno intersticial pode ser considerado o principal fator responsável pela piora progressiva da função contrátil do miocárdio na cardiopatia chagásica crônica (Lopes *et al.*, 1969).

Outros fatores, além da fibrose miocárdica, participam das alterações histopatológicas responsáveis pela miocardiopatia chagásica. Entre eles, as lesões do sistema nervoso autônomo intrínseco do coração são muito frequentes e encontradas tanto em pacientes com a forma avançada da doença, exibindo alterações do ritmo e insuficiência cardíaca congestiva (Lopes *et al.*, 1969), como em indivíduos aparentemente assintomáticos e, ainda, em outros que, sem terem

apresentado sintomatologia prévia perceptível, tiveram morte súbita (Lopes *et al.*, 1995). Aspecto patogênético importante é a ativação crônica de fatores inflamatórios no miocárdio, que pode ser um dos elementos que implicam em pior prognóstico desta doença quando comparada a cardiopatias de outras etiologias (Mocelin *et al.*, 2005).

Uma consequência importante das lesões miocárdicas é a disfunção ventricular. Com a destruição das fibras miocárdicas e sua substituição por fibrose, entram em ação mecanismos de compensação, por meio da hipertrofia das fibras íntegras e dilatação da cavidade ventricular, visando à manutenção do débito cardíaco, da pressão arterial e da perfusão tissular em níveis adequados. Entretanto, com a evolução da miocardite e com a distensão excessiva das fibrocélulas remanescentes, esse processo de compensação vai se tornando inapropriado, surgindo, então, as manifestações clínicas de insuficiência cardíaca (Rassi; Rassi; Little, 2000).

A presença de focos inflamatórios e áreas de fibrose no miocárdio contrátil, ou na rede de Purkinje, pode produzir alterações eletrofisiológicas múltiplas e favorecer o aparecimento do fenômeno de reentrada, principal mecanismo eletrofisiológico das taquiarritmias ventriculares (De Paola *et al.*, 1987). As arritmias são extremamente frequentes e dos mais variados tipos nos pacientes com doença de Chagas e, à semelhança de outras miocardiopatias, a sua presença, e, em especial, a sua gravidade, influenciam o prognóstico (Rassi *et al.*, 1985; Rassi Junior *et al.*, 1995). Há evidências de que a densidade da arritmia ventricular é significativamente maior na insuficiência cardíaca de etiologia chagásica, quando comparada à de outras etiologias (Rassi Junior *et al.*, 1995). A morte súbita constitui um dos fenômenos mais expressivos da história natural da cardiopatia chagásica crônica, acometendo indivíduos nas etapas mais produtivas de suas vidas e constitui a principal causa de óbito nesta enfermidade (Prata *et al.*, 1985).

A despeito da enorme importância clínicoepidemiológica da cardiopatia chagásica crônica em nosso meio, as definições de conduta clínica referentes aos

cuidados dos pacientes com esta condição habitualmente derivam da transposição de conhecimentos adquiridos no estudo de outras cardiopatias (Rocha *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2007; Nunes, M. C. *et al.*, 2012).

Sob o aspecto fisiopatológico – hemodinâmico, inflamatório e neuro-hormonal, a miocardiopatia chagásica não parece diferir da miocardiopatia idiopática (Dec e Fuster, 1994). Julga-se, habitualmente, assim, que poder-se-iam extrapolar os resultados dos grandes ensaios clínicos em insuficiência cardíaca a todos os pacientes com miocardiopatia dilatada, inclusive aos chagásicos. Todavia, sabe-se que a forma cardíaca da doença de Chagas apresenta peculiaridades patogênicas e imunopatogênicas, como muito mais extensa fibrose, disfunção autonômica com várias formas de bloqueio atrioventricular e intraventricular, autoimunidade com produção de anticorpos dirigidos a cardiomiócitos, receptores beta-adrenérgicos e neurônios, tornando-a singular sob vários aspectos. Os mecanismos intrínsecos e peculiares a cada paciente e que determinam, pelo menos em parte, o padrão evolutivo da cardiopatia chagásica crônica ainda não foram completamente desvendados. Entretanto, há evidências de que o prognóstico dessa cardiopatia dependa da forma de expressão do acometimento miocárdico (Nunes *et al.*, 2013). O mau prognóstico da cardiopatia chagásica pode ser atribuído à gravidade das arritmias ventriculares (Martinelli Filho *et al.*, 2000), à disautonomia (Marin-Neto *et al.*, 2007; Davila *et al.*, 2012) e às anormalidades de perfusão no miocárdio (Marin-Neto *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 2010). No entanto, a patogênese da doença de Chagas é complexa e a razão pela qual ela cursa com pior prognóstico em relação às outras cardiopatias ainda não foi estabelecida (Nunes *et al.*, 2013).

A estratificação de risco é importante na avaliação terapêutica e prognóstica dos pacientes com cardiopatia chagásica. Os preditores clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos tradicionais perdem seu valor prognóstico independente quando testados em um modelo multivariado que inclua estimativa direta da gravidade do acometimento miocárdico (Rassi *et al.*, 2007). O

ecodoppler cardiograma, por sua capacidade de quantificar, de forma objetiva, a lesão miocárdica, possui amplo potencial para avaliação da morbidade e do prognóstico dos pacientes com doença de Chagas (Nunes *et al.*, 2010).

## 2.2 Imunopatogenia da cardiopatia chagásica crônica

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença são, ainda, pouco compreendidos. A análise de particularidades na patogênese das diferentes formas clínicas sugere que múltiplos fatores possam estar envolvidos no seu estabelecimento. As reações inflamatórias, observadas tanto durante a fase aguda quanto crônica da infecção, parecem ter importante papel no desenvolvimento da enfermidade. Nos tecidos afetados, ocorre produção local de vários mediadores imunológicos, causando intensa migração de leucócitos durante a interação entre o parasito e as células do hospedeiro (Reis *et al.*, 1997; Chandrasekar *et al.*, 1998). O prolongado período de latência e a escassez no número de parasitos, contrapostos à intensidade e à extensão das lesões, são fatores que têm levado diversos autores a propor o envolvimento de fatores autoimunes na patogênese da lesão chagásica. Alguns identificam, ainda, a existência de reação cruzada entre componentes autólogos e antígenos do *T. cruzi* (Wood *et al.*, 1982; Acosta e Santos-Buch, 1985; Van Voorhis e Eisen, 1989; Levitus *et al.*, 1991; Cunha-Neto *et al.*, 1995; Cunha-Neto *et al.*, 1996; Kalil e Cunha-Neto, 1996; Kierszenbaum *et al.*, 1996; Al-Sabbagh *et al.*, 1998; Kierszenbaum, 1999).

Nesse contexto, a resposta imune do hospedeiro que se segue à infecção pelo *T. cruzi* representa um importante fator na determinação do controle da parasitemia e progressão da cardiopatia chagásica, desta forma selando o destino da infecção (Dutra *et al.*, 2005; Dos Reis, 2011).

Embora diversos trabalhos utilizando modelos experimentais tenham definido a importância das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como de células NK, macrófagos e células B na infecção pelo *T. cruzi* (Laguens *et al.*,

1981; Hontebeyrie-Joskowicz *et al.*, 1987; Rottenberg *et al.*, 1988; Araujo, 1989; Tarleton, 1990; Hontebeyrie-Joskowicz, 1991; Dos Santos *et al.*, 1992; Tarleton *et al.*, 1992; Rottenberg *et al.*, 1993; Brener e Gazzinelli, 1997; Soares e Santos, 1999), esses parâmetros não estão ainda totalmente esclarecidos na infecção humana.

A avaliação das populações celulares envolvidas na infecção humana mostrou que células B CD5<sup>+</sup> estão presentes em alto percentual na circulação de pacientes com doença de Chagas, sugerindo relação entre esses fenótipos celulares e o desenvolvimento de autoimunidade nessa doença (Dutra *et al.*, 1994). É importante salientar que essa população de linfócitos é capaz de produzir autoanticorpos relacionados a processos autoimunes no homem (Hardy e Hayakawa, 1986; Hardy *et al.*, 1994).

Uma estratégia alternativa para caracterizar o perfil global de células, tanto da imunidade inata como da adaptativa, correlacionando esses perfis com formas distintas da cardiopatia chagásica crônica, sugere que linfócitos T CD4<sup>+</sup> constituem as principais populações celulares envolvidas no perfil regulatório em pacientes com forma indeterminada. Por outro lado, verificou-se que monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> determinam o perfil inflamatório em pacientes com cardiomiopatia (Gomes *et al.*, 2003; 2005; 2014; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008). Verificou-se que linfócitos T CD8<sup>+</sup> são muito importantes e são o tipo celular predominante no infiltrado inflamatório no miocárdio desses pacientes (Reis *et al.*, 1993). Além disso, demonstrou-se recentemente que, além do papel dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> na ação citotóxica sobre a célula infectada, eles também agem sobre o parasito intracelular por meio da granzima que faz com que sua membrana citoplasmática se torne permeável. Esses achados reforçam que a granzima B, de fato, age sobre a célula do hospedeiro, mas, o mecanismo de eliminação de parasitos intracitoplasmáticos, como *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania major* é feito pela liberação de granzima por linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Mais importantemente, demonstrou-se que os mecanismos de ação citotóxica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e de seus elementos como,

granzima, perforina e granzima, nesses parasitos intracitoplasmáticos, são independentes (Dotiwala *et al.*, 2016).

A importância das células T na doença de Chagas está apoiada tanto nos achados que demonstram a sua resposta *in vitro* como nos dados que evidenciam a presença dessas células no infiltrado inflamatório verificado no miocárdio de pacientes com cardiomiopatia chagásica. O infiltrado cardíaco de pacientes com a forma cardíaca apresenta razão de 2:1 de células T CD8<sup>+</sup> em relação às células T CD4<sup>+</sup>, sugerindo o papel da citotoxicidade no dano miocárdico (Higuchi *et al.*, 1993). Em 2006, Vitelli-Avelar e colaboradores observaram que linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes com a forma indeterminada possuem elevado potencial migratório, o que seria importante no controle do parasitismo tecidual. Análise adicionais em um estudo realizado em 2012 mostrou que pacientes com forma indeterminada expressam elevada frequência de linfócitos CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>IFN<sup>+</sup> quando comparados aos indivíduos não infectados (Sathler-Avelar *et al.* 2012).

Linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> provenientes do sangue periférico de pacientes com cardiomiopatia chagásica exibem mais frequência de células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> quando comparados aos de indivíduos não chagásicos (Dutra *et al.*, 1996). Considerando-se a importância do CD28 para a ativação das células T, essa observação pode significar que diferentes etapas de ativação dos linfócitos ou eventos imunorreguladores distintos estejam ocorrendo no curso da infecção chagásica (Dutra *et al.*, 2000).

Os mecanismos utilizados na regulação da resposta imune em diferentes infecções ainda não estão totalmente esclarecidos. As células T coexpressando CD4 e altos níveis da molécula CD25 foram descritas como sendo células com elevada capacidade de suprimir a produção de citocinas e a proliferação celular a partir do contato célula-célula, sendo denominadas células T reguladoras (Treg) (Shevach *et al.*, 2011). Entretanto, tem-se observado a participação de células T reguladoras exercendo papel protetor durante o curso crônico da infecção (Baecher-Allan *et al.*, 2001).

Pacientes com a forma indeterminada apresentam percentuais elevados de células Treg quando comparados àqueles com cardiomiopatia e indivíduos não chagásicos (Vitelli-Avelar *et al.*, 2005; Araujo *et al.*, 2007; De Araujo *et al.*, 2011; De Araujo *et al.*, 2012), sugerindo que essas células poderiam controlar as funções efetoras dos linfócitos T induzidas pelo *T. cruzi*. Apesar de muitos estudos em vários modelos, o mecanismo pelo qual células Treg limitam as respostas efetoras permanece não está completamente definido (Martins *et al.*, 2004; De Araújo *et al.*, 2012).

Citocinas são importantes mediadores inflamatórios envolvidos na manutenção do processo inflamatório, podendo estimular ou inibir a resposta imune (Sher *et al.*, 1992). Além disso, esses mediadores estão associados à indução das respostas Th1 e Th2, que envolve outros fatores como: genéticos, sinais coestimulatórios e a natureza do estímulo antigênico (Hafler, 2007). As citocinas apresentam um importante papel na polarização da resposta imune, na manutenção e diferenciação celular. Citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-12, IL-18, IL-23, IL-27 estão envolvidas na polarização da resposta Th1 promovendo a imunidade mediada por células contra patógenos intracelulares. Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, e IL-13 estão envolvidas na polarização da resposta Th2, predominante em reações alérgicas bem como em respostas humoral e celular contra helmintos, parasitas e patógenos extracelulares (Romagnani, 2000).

As citocinas desempenham importante papel na regulação da resposta imune e estão envolvidas tanto na resistência quanto em mecanismos relacionados ao desenvolvimento de enfermidade na doença de Chagas (Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2014). Vários estudos têm detectado associação entre IFN- $\gamma$  e a resistência do hospedeiro à infecção experimental pelo *T. cruzi* (Reed, 1988; McCabe *et al.*, 1991; Nabors e Tarleton, 1991; Torrico *et al.*, 1991; Munoz-Fernandez *et al.*, 1992; Vespa *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 1995; Cardillo *et al.*, 1996; Holscher *et al.*, 1998), na qual essa citocina ativa macrófagos, aumentando a



produção de óxido nítrico (NO) que, por sua vez, inibe a replicação intracelular do parasito (Reed, 1988; Gazzinelli *et al.*, 1992; Vespa *et al.*, 1994). Por outro lado, a IL-10 é capaz de reduzir a ativação induzida por IFN- $\gamma$ , inibindo tanto a liberação de NO quanto a diferenciação de células T-*helper* (Th1) (Silva *et al.*, 1992; Reed *et al.*, 1994; Abrahamsohn e Coffman, 1996).

Em pacientes com cardiomiopatia chagásica, observa-se alta frequência de células T CD4<sup>+</sup> e de T CD8<sup>+</sup> efectoras, secretoras de altos níveis das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e diminuição de células com perfil regulador e baixa produção de IL-10 (Gomes *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005; Sathler-Avelar *et al.*, 2006; Vitelli-Avelar *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2007; Cunha-Neto *et al.*, 2009; De Araujo *et al.*, 2011; De Araujo *et al.*, 2012; Cunha-Neto e Chevillard, 2014)).

Por outro lado, os pacientes com forma indeterminada, além de apresentarem células ativadas produzindo citocinas inflamatórias, possuem também elevação no número de células com atividade reguladora e alta produção de citocinas reguladoras como: fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ) e IL-10 (Gomes *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2007; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; Cunha-Neto *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2012; Dutra *et al.*, 2014; Cunha-Neto e Chevillard, 2014).

Demonstrou-se que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com cardiomiopatia e forma indeterminada possuem perfis distintos de secreção de citocinas em resposta a antígenos do *T. cruzi* (Bahia-Oliveira *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005). Nesse contexto, a relação da produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 em grupos de pacientes com diferentes graus de acometimento cardíaco têm-se mostrado importantes para o esclarecimento de possíveis mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento da doença (Sousa *et al.*, 2014). Em pacientes com cardiomiopatia, foi constatada relação direta entre alto grau de acometimento cardíaco e produção de IFN- $\gamma$  evidenciada após a estimulação de PBMC por antígenos de *T. cruzi*. No entanto, em pacientes com forma indeterminada, foram descritos menores valores na razão entre IFN- $\gamma$  e IL-10, quando comparados aos demais grupos de pacientes (Gomes *et al.*, 2003;

Sousa *et al.*, 2014). Outros trabalhos também relataram expressão diferencial de citocinas inflamatórias em lesões no miocárdio, especialmente TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Higuchi *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1993; Nogueira *et al.*, 2014).

Recentemente, em estudo envolvendo uma grande *coorte* de pacientes com formas polares da doença de Chagas – forma indeterminada e cardiomiopatia dilatada, bem como indivíduos saudáveis, não chagásicos controles, verificou-se que pacientes com forma indeterminada apresentam níveis plasmáticos mais altos de IL-10 quando comparados aos demais grupos. Por outro lado, os níveis de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 foram mais elevados no grupo de pacientes com cardiomiopatia. Além disso, a alta expressão de IL-10 correlacionou-se com melhor função cardíaca, determinada pela fração de ejeção e diâmetro diastólico ventricular esquerdo. Por outro lado, altos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 correlacionaram-se com maior morbidade, expressa pela disfunção cardíaca observada nos pacientes com cardiomiopatia (Sousa *et al.*, 2014). Esses achados, além de reforçar observações prévias da literatura (Dutra *et al.*, 1997; Bahia-Oliveira *et al.*, 1998; Dutra *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2003; Menezes *et al.*, 2004; Talvani *et al.*, 2004; Vitelli-Avelar *et al.*, 2008; De Araujo *et al.*, 2012) pôde evidenciar, pela metodologia utilizada, a ampla dispersão de citocinas observada na cardiopatia chagásica crônica sob condições naturais (Sousa *et al.*, 2014).

Com base nos aspectos imunológicos, a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* pode ser caracterizada pelo balanço entre o sinergismo de eficiente resposta imune (inata e adaptativa) e a presença de poucos parasitos nos órgãos do hospedeiro. Esse balanço pode levar a um longo período assintomático da doença, mas, em significativa porção dos pacientes, por razões desconhecidas, ocorre distúrbio nessa regulação, favorecendo o aparecimento das manifestações clínicas graves da doença na fase crônica (Jones *et al.*, 1993; Dutra *et al.*, 2014).

Portanto, é possível que o acometimento miocárdico na doença de Chagas seja, pelo menos em parte, consequência de longa e complexa interação entre a

persistência do parasito e mediadores do sistema imune, que constituiria o principal fator responsável pelos danos teciduais, favorecendo a persistência da inflamação cardíaca, a perda de cardiomiócitos e a fibrose reparativa subsequente.

A despeito do grande número de estudos relacionados com a imunopatogenia da doença de Chagas, pouco ainda se conhece a respeito do perfil das citocinas e quimiocinas no direcionamento da resposta imune e do curso da infecção progressiva na doença de Chagas.

### **2.3 Interleucina 17**

A família da IL-17 é constituída por um conjunto de citocinas que participam da resposta inflamatória tanto aguda como crônica. Desde a descoberta da IL-17A, habitualmente denominada IL-17 ou CTLA8, em 1993, cinco outros membros desta família – IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também denominada IL-25) e IL-17F (Figura 1) – foram identificadas com base na homologia da sequência do aminoácido (Rouvier *et al.*, 1993; Yao, Painter, *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2000; Hymowitz *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Starnes *et al.*, 2002). Os genes codificadores dessas citocinas localizam-se em diferentes cromossomos, com exceção da IL-17A e IL-17F, cujos genes localizam-se no cromossomo 6 em humanos e no cromossomo 1 em camundongos (Awasthi e Kuchroo, 2009). Enquanto algumas dessas citocinas encontram-se bem caracterizadas, outras permanecem pouco compreendidas (Gu *et al.*, 2013).

A citocina mais amplamente investigada desta família, IL-17A, é considerada como uma citocina próinflamatória que assume papel essencial na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas, estando envolvida na patogênese de diversas condições mórbidas, como doenças autoimunes, alterações metabólicas e câncer (Ye *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Ouyang *et al.*, 2008;

Ishigame *et al.*, 2009; Ahmed e Gaffen, 2010; Milner, 2011; Kuchroo *et al.*, 2012; Trinchieri, 2012; Gallimore e Godkin, 2013).

Por meio da produção de uma variedade de moléculas incluindo-se citocinas próinflamatórias, principalmente, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos, mucinas e metalaproteinases de matriz (Gaffen, 2008; Chang e Dong, 2011), a IL-17A pode propagar cascatas de eventos que levam ao recrutamento de neutrófilos, inflamação e defesa do hospedeiro. A produção exacerbada de IL-17A acarreta inflamação excessiva e dano tecidual. Esta citocina tem recebido considerável atenção após a descoberta de um subconjunto de células T auxiliares (Th) CD4<sup>+</sup> distinto das linhagens clássicas Th1 e Th2, que produzem IFN- $\gamma$  e IL-4, respectivamente. Esta linhagem Th17 produz IL-17A, que desempenha um papel imunológico e inflamatório nas doenças autoimunes e inflamatórias.

Ressalta-se que, a IL-17A não é produzida, exclusivamente, pelas células Th17. Vários tipos celulares da imunidade inata, tais como macrófagos, células dendríticas (DCs), células NK, células T *Natural Killer* (NKT) e células T também secretam essa citocina (Onishi e Gaffen, 2010; Jin e Dong, 2013; Iwasaki e Medzhitov, 2015). Dessa forma, é mais adequado referir à citocina IL-17A de modo geral, sem restringi-la ao tipo celular Th17 (Gaffen, 2009; Jin e Dong, 2013; Iwasaki e Medzhitov, 2015).

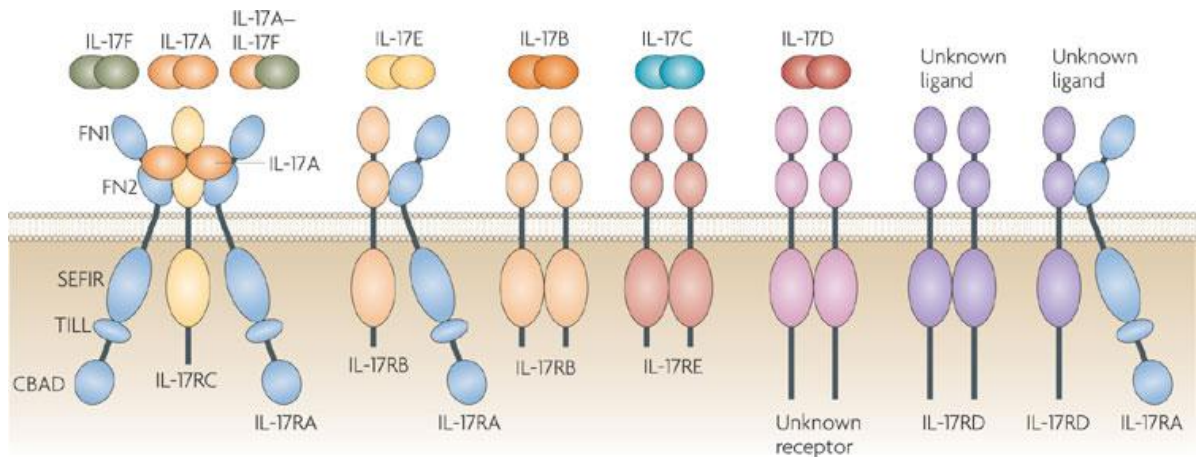
Em 1995, o IL-17RA foi identificado como um novo receptor de IL-17A (Yao, Fanslow, *et al.*, 1995). A família de receptores de IL-17 atualmente consiste de cinco membros (IL-17RA, RB, RC, RD and RE), todos os quais, tal como seus ligantes, compartilham sequências homólogas (Figura 1). O IL-17RA é ambigualmente expresso em uma ampla variedade de tecidos e tipos celulares. Após a estimulação com IL-17, o IL-17RA inicia a ativação de vias de sinalização que induzem a produção de moléculas próinflamatórias. Entretanto, a IL-17RA, isoladamente, é insuficiente para a sinalização mediada por IL-17 (Gu *et al.*, 2013).

A resposta mediada pela IL-17 tem sido relacionada com a patogênese de diversas doenças inflamatórias e autoimunes (Da Matta Guedes *et al.*, 2010; Miyazaki *et al.*, 2010; Bermejo *et al.*, 2013). Entretanto, os achados de estudos de células NKT invariantes na infecção por *Leishmania donovani* demonstram uma via de regulação induzida por IL-17 (Beattie *et al.*, 2010). Em relação à possível participação da IL-17 na doença de Chagas, os relatos existentes na literatura ainda são extremamente escassos e se referem, na grande maioria, a estudos experimentais de infecção aguda com *T. cruzi* em animais (Monteiro *et al.*, 2007; Guedes *et al.*, 2010; Miyazaki *et al.*, 2010; Leon & Lund, 2013). Verificou-se que a infecção por *T. cruzi* no modelo murino leva à produção de IL-17 por células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup>, células T *natural killer* e células T gama delta (Miyazaki *et al.*, 2010). Embora a alta expressão de IL-17 tenha sido associada com a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, observou-se menor taxa de sobrevivência em camundongos deficientes de IL-17A (IL-17A<sup>-/-</sup>) infectados por *T. cruzi* quando comparados a camundongos selvagens e expressão mais baixa de IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , sugerindo um importante papel da IL-17 na resolução da infecção por *T. cruzi* (Miyazaki *et al.*, 2010). Em outro estudo, por outro lado, o bloqueio de IL-17 resultou em aumento no recrutamento de células inflamatórias, maior expressão de quimiocinas específicas do tipo 1, como CCL2, CCL3, CCL4, CCL11 e CXCL9, elevada produção de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , bem como redução da carga parasitária no miocárdio dos camundongos infectados (Da Matta Guedes *et al.*, 2010).

Apesar de a maioria dos estudos sobre IL-17 em doenças humanas ter associado a expressão desta citocina com processos inflamatórios e autoimunes (Tesmer *et al.*, 2008), evidências preliminares de estudos tanto em modelos experimentais (Tosello Boari *et al.*, 2012) como em humanos (De Araujo *et al.*, 2012; Guedes *et al.*, 2012; Magalhaes *et al.*, 2013) indicam que esta citocina estaria associada com a resposta imune protetora ao invés de patogênica na doença de Chagas. Verificou-se que células T reguladoras de pacientes com a forma indeterminada são capazes de produzir altos níveis de IL-17 e IL-10 quando

comparados aos indivíduos não infectados ou com a forma cardíaca da doença (De Araujo *et al.*, 2012). Observa-se, assim, que o papel da resposta imune mediada pela IL-17 na doença de Chagas, permanece controverso e carente de esclarecimentos.

FIGURA 1 - Família de receptores de IL-17, interação com os ligantes e suas principais características estruturais



Nature Reviews | Immunology

Até o momento, cinco membros de receptores da superfamília de IL-17 foram identificados, como indicado na figura 1. Os vários complexos de receptores que correspondem a cada ligante estão indicados, embora deva ser enfatizado que em nenhuma instância a estequiometria foi demonstrada. O receptor de IL-17D é desconhecido, como também é o ligante de IL-17RD/SEF ou IL-17RA/IL-17RD, se este existir. FN, domínio do tipo fibronectina III; SEFIR, domínio de sinalização relacionado a SEF/IL-17R; TILL, loop do tipo TIR; CBAD, domínio de ativação C/EBPbeta

Fonte: (Gaffen, 2009).

## 2.4 Quimiocinas e seus receptores

As quimiocinas são proteínas secretoras quimiotáticas que controlam o perfil migratório e o posicionamento das células do sistema imune. São produzidas por leucócitos e células teciduais constitutivamente ou após indução, e exercem seus efeitos de forma autócrina ou parácrina. Todavia, as quimiocinas são, molecularmente, menores que as citocinas e exercem suas funções por meio de receptores acoplados à proteína G, considerados essenciais para atração de leucócitos (Griffith *et al.*, 2014).

A função das quimiocinas é importante para a movimentação de todas as células que fazem parte do sistema imune, necessárias para o desenvolvimento e homeostase celular, geração de células primárias e resposta humoral (Griffith *et al.*, 2014). A família das quimiocinas é constituída por 40 membros (Quadro 1) e subdividida em quatro subfamílias, com base na localização das duas primeiras moléculas de cisteínas (Matsushima *et al.*, 2011). A molécula das quimiocinas é constituída por 70 aminoácidos que se ligam ao heparansulfato de proteoglicanos. Essa molécula possui uma homologia estrutural baseada em resíduos conservados de cisteína (Zlotnik e Yoshie, 2000). As quatro subfamílias de quimiocinas são CC, CXC, XC e CX3C. As duas primeiras subfamílias são as principais, sendo identificadas pela posição dos dois primeiros resíduos de cisteína que podem ser adjacentes (CC) ou separados por um aminoácido variável (CXC). As cisteínas formam pontes dissulfeto que mantêm as regiões amino terminais ligadas, o que é essencial para atividade biológica das quimiocinas (Baggiolini, 2001). Geralmente, as quimiocinas formam dímeros ou tetrâmeros em solução e seus receptores formam homodímeros ou heterodímeros. No entanto, o significado da formação de dímeros pelos receptores de quimiocinas permanece sem resposta. As quimiocinas CC são conhecidas pelo papel chave no recrutamento de monócitos e macrófagos. Já a família das quimiocinas CXC exerce papel essencial no recrutamento de neutrófilos, células B e células T (Griffith *et al.*, 2014).



As quimiocinas prototípicas – fator quimiotático de neutrófilos ou interleucina 8 (IL-8, CXCL8) e o fator quimiotático de monócitos MCAF/MCP-1 (CCL2) - foram clonadas e purificadas molecularmente no final da década de 80 no Instituto Nacional do Câncer, Estados Unidos (Yoshimura *et al.*, 1987; Matsushima *et al.*, 1988). Até esse período, a atividade quimiotática de neutrófilos e monócitos havia sido notada, mas as substâncias responsáveis por estas atividades não haviam sido identificadas. Apenas em 1992, no Congresso Internacional de Imunologia, as quimiocinas foram estabelecidas como citocinas quimioatraentes (Matsushima *et al.*, 2011). Atualmente, sabe-se que alguns patógenos mimificam quimiocinas, receptores de quimiocinas e moléculas agonistas/antagonistas. Além disso, as quimiocinas e seus receptores são considerados alvos promissores para a regulação da infiltração de leucócitos em doenças inflamatórias e alterações imunológicas (Matsushima *et al.*, 2011).

A resposta inflamatória que se segue à infecção pelo *T. cruzi* é essencial para a resistência do hospedeiro à infecção e também é responsável pelo espectro patológico heterogêneo observado na doença. Neste contexto, as quimiocinas parecem controlar o fluxo celular para o sítio da infecção pelo parasito. Por outro lado, é importante considerar que o *T. cruzi* possui diversos mecanismos invasores que permitem sua concomitante permanência e não identificação por anos (Teixeira *et al.*, 2002). Um desses mecanismos é a secreção de moléculas anti-inflamatórias tais como proteases e a modulação da função biológica de algumas quimiocinas. Entre as moléculas secretadas pelo *T. cruzi* há a denominada cruzipain, capaz de clivar quimiocinas como CCL2, CCL12 e CCL13. Neste caso, o parasito altera a função das quimiocinas CCL12 e CCL13, modulando a resposta por elas mediada (Benitez-Hernandez *et al.*, 2010). Na infecção experimental pelo *T. cruzi*, de forma geral, verificou-se que quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$ , como CXCL9, CXCL10 (Hardison, Wrightsman, *et al.*, 2006) e os ligantes do receptor CCR5 (CCL5, CCL3) possuem papel no controle parasitário durante a fase aguda, provavelmente pela atração de linfócitos T do tipo 1 (Cunha-Neto *et al.*, 2005;

Machado *et al.*, 2005; Hardison, Kuziel, *et al.*, 2006; Roffe *et al.*, 2010). Essa função também é exercida pela quimiocina CCL2, quimioatraente de monócitos, e seu receptor CCR2 (Cunha-Neto *et al.*, 2005; Hardison, Kuziel, *et al.*, 2006; Cunha-Neto *et al.*, 2009). Entretanto, pouco se conhece sobre as quimiocinas produzidas na fase crônica e menos ainda sobre o seu papel na evolução da fase aguda ou forma crônica assintomática para formas sintomáticas, o que se deve, em parte, à carência de modelos experimentais ideais que sejam capazes de mimetizar a evolução da infecção observada em humanos. Um modelo experimental, provavelmente, mais apropriado seria o canino – *Canis lupus familiaris*. (Guedes *et al.*, 2010). Observou-se que cães apresentando cardiomiopatia chagásica apresentam baixa expressão de CCL24 assim como alta expressão de CCL4, CCL5 e do receptor CXCR3 (Guedes *et al.*, 2010).

Com relação ao papel das quimiocinas na doença de Chagas humana, verificou-se correlação entre a expressão dos receptores CCR5 e CXCR3 e a presença de células produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no sangue de pacientes com cardiomiopatia, enquanto a frequência de células com este perfil era menor na circulação em pacientes assintomáticos (Gomes *et al.*, 2005). A possível correlação entre a presença de células expressando esses receptores e o grau de comprometimento cardíaco carece de confirmação (Talvani *et al.*, 2004).

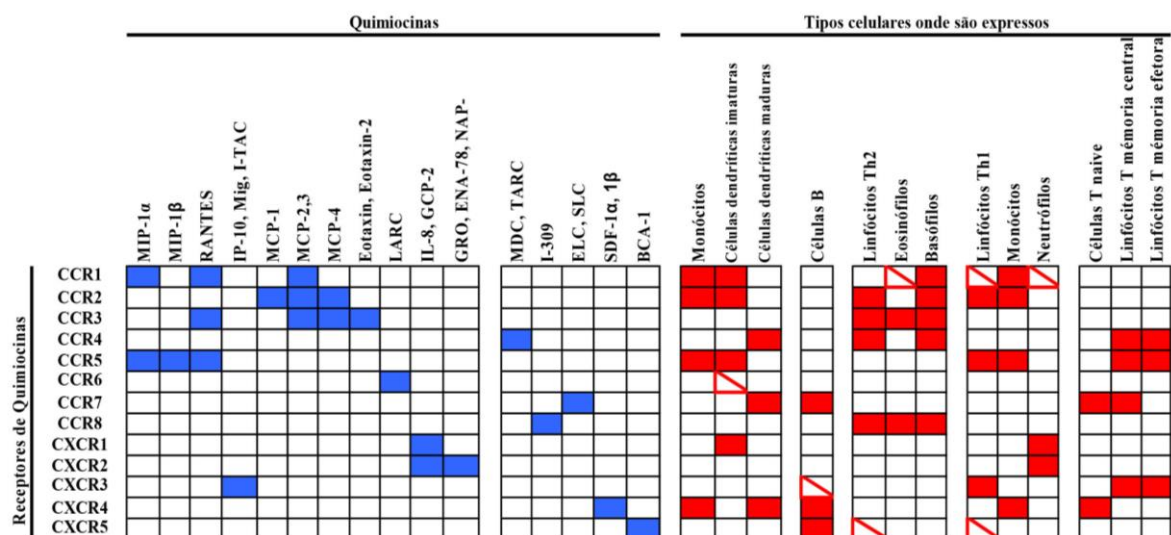
Observou-se, em pacientes chagásicos com cardiomiopatia, níveis aumentados de CCL2 quando comparados com pacientes com a forma indeterminada (Cunha-Neto *et al.*, 2005). Além disso, o mesmo grupo verificou expressão elevada dos receptores de quimiocinas CCR5, CXCR3 e CCR7 em células mononucleares presentes no miocárdio dos pacientes com cardiomiopatia chagásica, em comparação às amostras de doadores com cardiomiopatia de etiologia diversa (Cunha-Neto *et al.*, 2009).

Outros trabalhos também evidenciaram a importância das quimiocinas para o desenvolvimento de algumas cardiopatias. Elevada expressão de CCL1 e CXCL9 pode ser observada em biópsias de válvulas cardíacas provenientes de pacientes

com doença cardíaca reumática (Fae *et al.*, 2013). Verificou-se também que, na doença de Chagas, a intensidade da miocardite é controlada pelo polimorfismo de CXCL9 e CXCL10 (Nogueira *et al.*, 2012). Além disso, CXCL9 parece exercer papel importante na modulação do eixo das quimiocinas que se ligam em CXCR3/CCR5 e na intensidade da migração de células mononucleares para o miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica. Além disso, verificou-se, em modelo experimental, que as quimiocinas CXCL9 e CXCL10 exercem papel imune protetor e aparentemente não contribuem para a inflamação cardíaca após a infecção experimental pelo *T. cruzi* (Hardison, Wrightsman, *et al.*, 2006).

A expressão dos receptores de quimiocinas nos diferentes tipos celulares e seus ligantes é apresentada, a seguir, na Figura 2.

FIGURA 2 – Expressão dos receptores de quimiocinas nos diferentes tipos celulares e seus ligantes



A figura foi modificada de Sallusto *et al.* (1998) e representa algumas quimiocinas e seus receptores descritos em humanos. Em azul representam-se determinados tipos celulares; quadrados completamente preenchidos em vermelho representam determinados tipos celulares.

### 2.4.1 Quimiocinas CCL2, CXCL9 e CXCL10

A quimiocina CCL2 se liga ao receptor CCR2 e medeia o recrutamento principalmente de monócitos LY6Chigh (Figura 3). A CCL2 foi purificada e clonada em 1989 em gliomas humanos e células mielomonocíticas por dois grupos de pesquisas independentes, com base na habilidade quimiotática de monócitos apresentada pela CCL2. Desde então, a CCL2 tem sido descrita como quimiotática não apenas para monócitos, mas também para células *Natural Killer* (NK), linfócitos T de memória e provavelmente células dendríticas, resultando na migração destas células para o local da inflamação. A CCL2 pode ser encontrada em diversos tecidos e pode ser produzida por várias células como fibroblastos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, astrócitos, células endoteliais e osteoclastos (Yoshimura *et al.*, 1989).

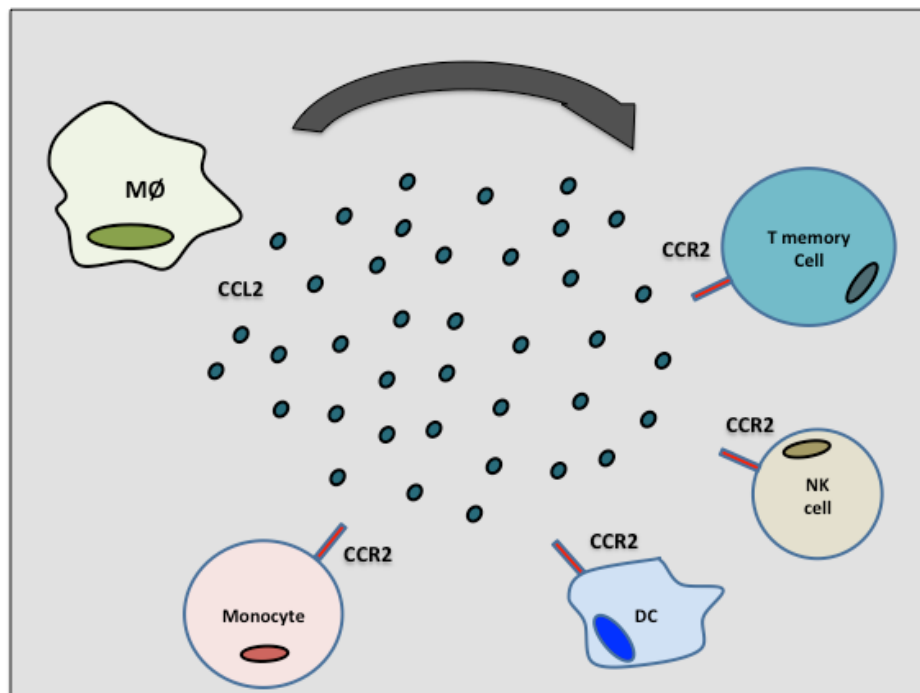
A figura 1 ilustra a secreção e células alvo da quimiocina CCL2, descrito previamente. A produção de CCL2 é induzida por estresse oxidativo, citocinas e fatores de crescimento. Em seguida, a CCL2 se liga ao CCR2, receptor acoplado a proteína G, o que ativa vias de sinalização intracelulares que regulam a atividade quimiotática. O receptor CCR2 regula ambos os efeitos, proinflamatório e anti-inflamatório. Estudos utilizando camundongos *knockout* para CCR2 mostraram diminuição na expressão de RANK, que é regulado por meio das vias de sinalização que envolvem NF- $\kappa$ B e ERK1/2 (Deshmane *et al.*, 2009).

Apesar de a CCL2 ser importante para o recrutamento de diversas células *in vivo*, seu mecanismo de ação ainda não é bem compreendido. Uma hipótese se baseia na associação entre dímeros de CCL2 e glicosaminoglicanos teciduais. Desta forma, a CCL2 circulante se liga a glicosaminoglicanos em tecidos específicos e estabelece gradientes que guiam os monócitos aos sítios de infecção ou inflamação. No entanto, a substituição de aminoácidos na molécula CCL2 previne a dimerização e ligação com glicosaminoglicanos. A CCL2 circula pela linfa e se liga as vênulas endoteliais altas presentes nos linfonodos (Shi e Pamer, 2011; Talvani e Teixeira, 2011). Desta maneira, a CCL2 guia os monócitos pelos linfonodos.

Outros estudos demonstraram que o receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) se liga a CCL2 e a transporta através de células endoteliais até a região luminal, o que parece importante para o recrutamento de monócitos da corrente sanguínea para os tecidos inflamados (Shi e Pamer, 2011).

Muitas infecções induzem a produção de CCL2, resultando em elevados níveis séricos e no interior de tecidos inflamados (Shi e Pamer, 2011). O papel de CCL2 tem sido estudado na patogênese de diversas doenças, como artrite reumatóide, aterosclerose e vários tipos de câncer. Neste contexto, diversos tipos de anticorpos monoclonais neutralizadores de CCL2 estão sendo testados como potenciais elementos para o tratamento de diversas doenças (Zhang *et al.*, 2010).

FIGURA 3 - Modelo representativo de secreção da quimiocina CCL2



A figura mostra a secreção de CCL2 por macrófagos e as possíveis células alvo, como monócitos, células NK, células dendríticas e células T de memória. A interação entre CCL2 e CCR2, expresso nas células alvo, leva à migração celular para o sítio da inflamação e evidencia o papel quimiotático da quimiocina CCL2.

As quimiocinas CXCL9 e CXCL10 são membros da subfamília CXC, que compreende outras 14 quimiocinas. Ambas serão discutidas em conjunto, uma vez que, em associação com outra quimiocina (CXCL11), compartilham a propriedade de serem induzidas por IFN- $\gamma$ . Elas foram inicialmente denominadas “proteína 10 induzida por IFN- $\gamma$ ” (IP-10) e “monocina induzida por IFN- $\gamma$ ” (MIG). A partir da nova nomenclatura, elas passaram a ser chamadas de CXCL10 e CXCL9 respectivamente (Rotondi *et al.*, 2007). Estas quimiocinas não são constitutivamente expressas, mas são reguladas por um meio contendo citocinas pró-inflamatórias (Lacotte *et al.*, 2009).

Os genes responsáveis por CXCL9 e CXCL10 são encontrados nos genomas murino e humano. Além disso, CXCL9 e CXCL10 compartilham aproximadamente 37% de similaridade em sua estrutura molecular (Farber, 1997). Ambas, CXCL9 e CXCL10, se ligam a um único receptor, denominado CXCR3, acoplado à proteína G, descoberto em 1995 em um clone genômico isolado por PCR, com base na homologia de hibridização. A CXCL10 se liga ao CXCR3 com maior afinidade do que a CXCL9.

Inicialmente, o CXCR3 foi encontrado em linfócitos T circulantes, linfócitos B, células NK, e entre os linfócitos, linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) e células T citotóxicas. Em estudos subsequentes, descobriu-se que o CXCR3 não era expresso apenas por células do sistema imune, mas também por células mesenquimais, células estreladas do fígado humano, pericitos vasculares e células endoteliais microvasculares humanas (Rotondi *et al.*, 2007).

Recentemente, foi identificado um receptor distinto, derivado da recombinação alternativa do gene de CXCR3, denominado CXCR3B. As quimiocinas CXCL9 e CXCL10 também se ligam ao CXCR3B. A interação entre essas quimiocinas com CXCR3 regula a quimiotaxia e resposta imunológica. No entanto, a interação destas quimiocinas com CXCR3B gera um efeito antiangiogênico (Rotondi *et al.*, 2007).

Existe também a isoforma CXCR3A, expressa por leucócitos e células endoteliais, que apresenta função angiostática. Após a interação entre CXCL10 e CXCR3B, ocorre inibição da proliferação celular e promoção de apoptose. A interação entre CXCL10 e CXCR3A promove a proliferação e atividade quimiotática da quimiocina.

Por fim, existe a isoforma CXCR3-alt, embora pouco se saiba sobre sua atividade biológica (Van Den Borne *et al.*, 2014).

As quimiocinas CXCL9 e CXCL10 possuem atividade quimiotática em diferentes tipos celulares do sistema imune (Figuras 4 e 5). Em particular, linfócitos T ativados, células B, macrófagos e células NK, por apresentarem CXCR3, podem ser atraídos para os tecidos inflamados e, desta forma, fazer parte do infiltrado de células mononucleares, característico de determinadas reações inflamatórias. O fato de células Th1 produzirem IFN- $\gamma$ , que induz a produção, por diferentes tipos celulares, de CXCL9 e CXCL10, e estas quimiocinas, por sua vez atraírem células Th1, sugere a existência de uma conexão entre a produção de IFN- $\gamma$  por células Th1 e células residentes produzindo CXCL9 e CXCL10.

Alguns estudos suportam o conceito de que o papel das quimiocinas que se ligam ao CXCR3 vai além da atividade quimiotática em linfócitos ativados. Os achados enfatizam o papel da CXCL10 na iniciação e amplificação da resposta do hospedeiro a aloantígenos. Camundongos deficientes de CXCL10 apresentam resposta mediada por linfócitos T prejudicada, hipersensibilidade de contato deficiente e limitado infiltrado celular inflamatório. Observou-se que esses animais também são incapazes de controlar infecções virais.

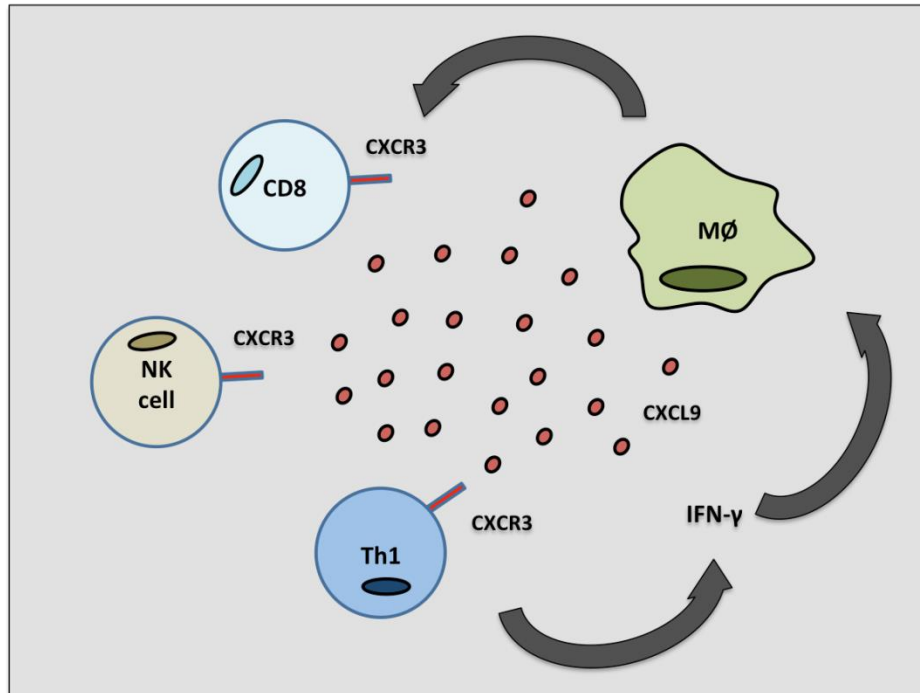
A CXCL10 também ativa a proliferação de linfócitos T induzidas por estimulação alogênica e antigênica e induz a secreção de IFN- $\gamma$  em resposta ao desafio antigênico. Ela regula positivamente a produção de citocinas do tipo Th1 e negativamente a secreção de citocinas do tipo Th2. O resultado final é a forte regulação positiva de reações inflamatórias, caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ . A CXCL10 exerce também importante papel protetor fornecido por células Th1

contra infecções causadas por bactérias e alguns tipos virais. Desta forma, esta quimiocina regula negativamente reações alérgicas dirigidas por células Th2 (Rotondi *et al.*, 2007).

A via induzida por CXCR3 parece estar envolvida no desenvolvimento de doenças autoimunes, principalmente por ampliação da inflamação em órgãos alvos, intensificando, assim, as manifestações clínicas. A expressão de CXCR3 tem sido relacionada com dois dos principais tipos de doença autoimune reumáticas sistêmicas: artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico (Lacotte *et al.*, 2009). Além disso, tem sido descrito o papel da CXCL10 em diversas doenças cardiovasculares tem sido extensamente descrito, como na aterosclerose, na formação de aneurisma e no infarto do miocárdio (Van Den Borne *et al.*, 2014). A CXCL9 também tem sido relacionada a doenças cardíacas, como doença reumática cardíaca crônica e rejeição ao transplante cardíaco (Karason *et al.*, 2006; Fae *et al.*, 2013). Portanto, torna-se importante o estudo destas quimiocinas no contexto das diversas doenças que acometem o miocárdio, especialmente aquelas marcadas pelo seu caráter fibrosante, como a doença de Chagas e, com isso, poder esclarecer aspectos relacionados com a história natural e a imunopatogenia destas enfermidades.

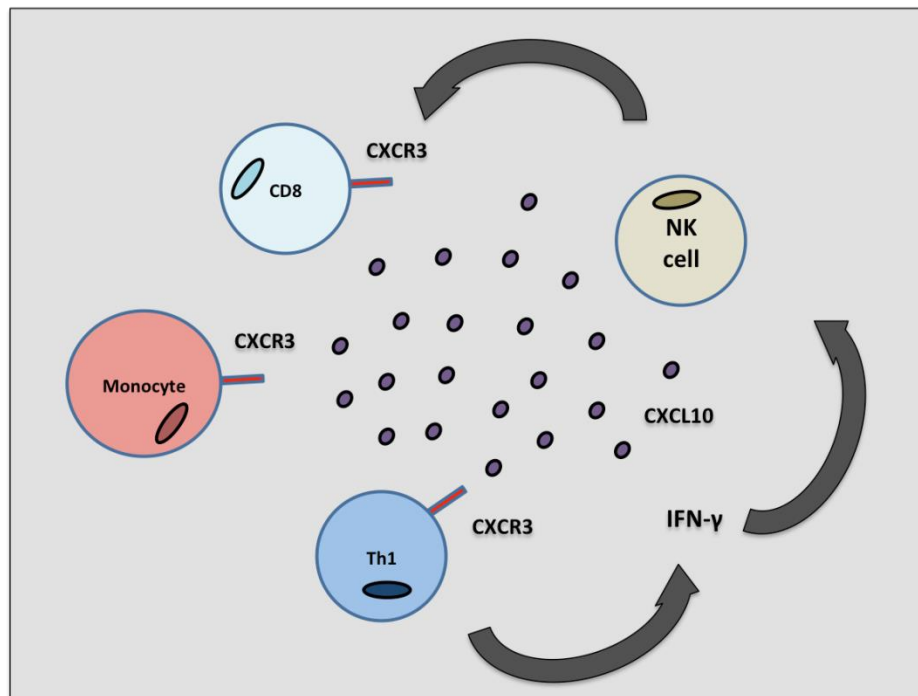


FIGURA 4 - Modelo representativo de secreção da quimiocina CXCL9



A figura mostra a secreção de CXCL9 por macrófagos e as possíveis células alvo, como células NK, células T CD8 citotóxicas e células Th1. A interação entre CXCL9 e CXCR3 expresso nas células alvo leva à migração celular para o local da inflamação. Células Th1 secretam IFN- $\gamma$ , que age em células como macrófagos e desencadeiam a secreção de CXCL9.

FIGURA 5 - Modelo representativo de secreção da quimiocina CXCL10



A figura mostra a secreção de CXCL10 por células NK e as possíveis células alvo, como monócitos, células T CD8 citotóxicas e células Th1. A interação entre CXCL10 e CXCR3 expresso nas células alvo leva à migração celular para o sítio da inflamação. Células Th1 secretam IFN- $\gamma$ , que age em células NK e desencadeiam a secreção de CXCL10.

## 2.5 Ecocardiografia na doença de Chagas

Na doença de Chagas, aspecto desafiador da complexa patogênese da cardiopatia crônica consiste na identificação dos mecanismos determinantes da progressão da miocardite crônica focal de muito baixa intensidade, identificável na forma indeterminada, para o dano miocárdico extenso e progressivo da forma crônica cardíaca (Bogliolo, 1976; Marin-Neto *et al.*, 2007).

A ecocardiografia representa um dos métodos complementares mais importantes na avaliação dos indivíduos chagásicos. A determinação da gravidade do comprometimento cardíaco representa, atualmente, uma das principais

indicações do método, fornecendo dados fundamentais para a orientação terapêutica e prognóstica (Acquatella, 2007; Nunes *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2013). Recentemente, foram introduzidas novas técnicas ecocardiográficas, como o Doppler tecidual, *strain*, *strain rate* e o ecocardiograma tridimensional, permitindo abordagem morfofuncional cardíaca de forma mais acurada e reproduzível (Nunes *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2013).

A função sistólica ventricular esquerda mensurada pela fração de ejeção constitui forte marcador prognóstico na doença de Chagas, independentemente do estágio clínico do paciente (Rassi *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2013). Dessa forma, o mais consistente e independente preditor de risco na cardiopatia chagásica é a disfunção ventricular esquerda, que se traduz em acentuado aumento da mortalidade tanto por progressão da insuficiência cardíaca, quanto por morte súbita e por acidente vascular cerebral (Samuel *et al.*, 1983; Rodriguez-Salas *et al.*, 1998; Rassi *et al.*, 2006; Rassi *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2013). Além disso, a alteração segmentar da contratilidade miocárdica representa um dos aspectos mais interessantes relacionados ao acometimento cardíaco na doença de Chagas. A detecção de alteração segmentar identifica os indivíduos chagásicos que podem evoluir com piora progressiva da função sistólica ventricular esquerda (Pazin-Filho *et al.*, 2006; Rassi *et al.*, 2006) e arritmias ventriculares (Barros *et al.*, 2011).

Até recentemente, a abordagem da cardiopatia chagásica restringia-se à análise da função sistólica do ventrículo esquerdo. Entretanto, as anormalidades da função diastólica exercem importante papel na fisiopatologia da insuficiência cardíaca secundária à doença de Chagas (Oliveira *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2010). Em 2010, verificou-se que parâmetros de disfunção diastólica constituem determinantes da capacidade funcional em pacientes com cardiomiopatia chagásica, independentemente da função sistólica (Lima *et al.*, 2010).

Estudos prévios registraram anormalidade precoce do relaxamento ventricular esquerdo em pacientes chagásicos (Caeiro *et al.*, 1985; Martinez Filho *et al.*, 1986). O acúmulo de fibras do colágeno intersticial na cardiopatia chagásica crônica pode, inicialmente, determinar alterações no relaxamento ventricular e, progressivamente, reduzir a complacência miocárdica e causar aumento da pressão atrial esquerda. A disfunção diastólica causa estiramento dos miócitos, levando ao remodelamento ventricular e intensa ativação neuro-hormonal (Barbosa *et al.*, 2007). Esses fatores contribuem para a evolução desfavorável da cardiopatia. Assim, a disfunção diastólica é um importante marcador de gravidade da doença (Barros *et al.*, 2001; Garcia-Alvarez *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2013).

Vários estudos avaliaram com mais acuidade as pressões de enchimento do ventrículo esquerdo com o emprego do Doppler tecidual. Recentemente, a relação entre a onda E do fluxo mitral (E) e a onda protodiastólica do anel mitral ao Doppler tecidual (e') foi proposta e validada como um índice das pressões de enchimento do ventrículo esquerdo (Ommen *et al.*, 2000). Empregando o Doppler tecidual, Barros e colaboradores caracterizaram os diversos padrões de enchimento ventricular na doença de Chagas e verificaram correlação entre pressões de enchimento elevadas e disfunção sistólica na quase totalidade dos pacientes acompanhados (Barros *et al.*, 2004). Posteriormente, verificou-se que a elevação da relação E/e' correlacionou-se com tradicionais índices de disfunção diastólica, constituindo, ainda, melhor preditor prognóstico em pacientes com miocardiopatia chagásica (Nunes *et al.*, 2012). Isso se deve ao fato de a relação E/e' ser um marcador mais acurado das pressões de enchimento, com valor prognóstico estabelecido na miocardiopatia chagásica (Nunes *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2013) o qual é diferente daquele observado em outras cardiopatias dilatadas de etiologia diversa (Wang *et al.*, 2003).

Por fim, o ecocardiograma permite quantificar a lesão miocárdica com grande potencial na avaliação da morbidade e do prognóstico dos pacientes com doença de Chagas (Nunes *et al.*, 2013). Dessa forma, esse método complementar

tem permitido uma melhor estratificação de risco, com perspectivas de impacto no manejo clínico da cardiopatia chagásica (Nunes *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012).

O presente estudo foi planejado para identificar um conjunto de biomarcadores associados com a morbidade e investigar o perfil de expressão de citocinas e quimiocinas no curso médio da infecção crônica pelo *T. cruzi*.

## 3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

### 3.1 Hipóteses

- Existe um padrão uniforme de expressão de citocinas e quimiocinas na doença de Chagas em pacientes com grau semelhante de morbidade;
- Existe associação entre o desenvolvimento e gravidade do acometimento cardíaco na doença de Chagas e o perfil da resposta imune expresso pela produção de citocinas e quimiocinas, inflamatórias e reguladoras.

### 3.2 Objetivo geral

- Verificar a existência de uniformidade na expressão de citocinas e quimiocinas e a possível associação destas com o grau de morbidade em pacientes com formas crônicas polares da doença de Chagas: IND (forma crônica indeterminada) e CARD (cardiomiopatia dilatada).

### 3.3 Objetivos específicos

**3.3.1** Verificar a possível associação entre o perfil da resposta imune, expressa pelos níveis relativos de produção das citocinas (IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e das quimiocinas (CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5 e CXCL8) plasmáticas, e os seguintes aspectos:

- a morbidade cardíaca, caracterizada pelas formas polares: IND e CARD;
- o grau de comprometimento cardíaco, caracterizado pelas variáveis ecocardiográficas: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (VED); relação E/e' e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE);

**3.3.2** Verificar a ocorrência de uniformidade ou variabilidade no nível de produção das citocinas (IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12) e das quimiocinas (CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5 e CXCL8) em pacientes chagásicos com IND e CARD.

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento do estudo**

O presente estudo consiste em análise agregada de amostras de plasmas coletados no período de 1994 a 2014. Trata-se de pesquisa observacional com corte transversal. As amostras de plasmas dos pacientes extraídas do sangue periférico, preservadas em *freezer* a  $-70^{\circ}\text{C}$  foram selecionadas e preparadas para dosagem dos níveis de citocinas e quimiocinas conforme protocolo de ensaio imunológico que será descrito adiante. Os dados foram armazenados em um banco de dados específico.

### **4.2 Descrição do local**

Os pacientes com doença de Chagas foram recrutados no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP Orestes Diniz) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais pelo seu coordenador.

O Ambulatório de Doença de Chagas foi transformado em centro de referência de atendimento ao paciente chagásico em Minas Gerais em 1991, recebendo indivíduos encaminhados por serviços de hemoterapia e postos de

saúde de Minas Gerais. Até o momento, equipe formada por docentes da Faculdade de Medicina da UFMG, médicos-residentes e alunos de pós-graduação já atendeu a mais de 2.500 pacientes chagásicos ou indivíduos encaminhados para esclarecimento de sorologia, clínica ou epidemiologia sugestiva de infecção chagásica.

#### **4.3 Caracterização geral da população estudada**

Todos os sujeitos da pesquisa assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICES A e B), após certificação do esclarecimento e da concordância com a participação voluntária do estudo. O cuidado clínico foi oferecido a todos, independentemente da aceitação ou não de participar do estudo. Na rotina de avaliação do comprometimento clínico e subclínico de comprometimento cardíaco, os pacientes foram submetidos aos exames complementares de eletrocardiografia convencional, ecodopplercardiografia, teste ergométrico e eletrocardiografia dinâmica (Holter). Todas as avaliações clínicas solicitadas foram realizadas nas dependências do Hospital das Clínicas da UFMG. Para fins de definição do grau de comprometimento cardíaco dos pacientes chagásicos, adotou-se classificação habitual do Ambulatório de Referência em Doenças de Chagas descrita no QUADRO 1 (Rocha *et al.*, 2003; 2007).



QUADRO 1 - Classificação clínica da cardiopatia chagásica crônica

<b>Grupo clínico</b>	<b>Caracterização</b>
FCI	Assintomático, sem alterações significantes ao exame físico, ECG, radiografia de tórax, esofagograma e enema baritado. Sem alterações na avaliação por técnicas mais sensíveis (ecocardiograma, teste ergométrico e holter).
CCC1	Assintomático, sem alterações significantes ao exame físico, ECG, radiografia de tórax, esofagograma e enema baritado. Técnicas sensíveis são capazes de detectar anormalidades cardíacas de gravidade variável: Holter (extrassistolia ventricular complexa ou isolada frequente, bloqueios AV e IV intermitentes); teste ergométrico (extrassistolia ventricular esforço induzida, queda na pressão arterial); ecocardiograma (aneurisma, disfunção diastólica, hipocontratilidade segmentar ou global, aumento das cavidades).
CCC2	Pacientes sem manifestação de insuficiência cardíaca ou em classe funcional II de NYHA e sem aumento da silhueta cardíaca. Apresentam alterações eletrocardiográficas leves como transtornos da condução intraventricular do estímulo, HBAE, alterações difusas da repolarização ventricular.
CCC3	Pacientes sem manifestação de insuficiência cardíaca ou em classe funcional II de NYHA e sem aumento da silhueta cardíaca. Podem ter distúrbios de condução avançados, como BCRD, associado ou não a HBAE, BCRE, BAV do segundo grau Mobitz tipo I ou II, BAVT, além de ondas Q anormais, ondas T simétricas difusamente negativas, podendo haver associação com extrassistolia ventricular leve a moderada. Os transtornos de condução de estímulo dominam a apresentação clínica.
CCC4	Como no grupo anterior, pacientes não mostram sinais de aumento cardíaco. Porém, os desse grupo exibem extrassístoles ventriculares frequentes, complexas, que dominam a apresentação clínica.
CCC5	Pacientes com sinais clínicos radiológicos e, principalmente, ecocardiográficos de aumento cardíaco, com disfunção da contratilidade ventricular global, com ou sem manifestações de insuficiência cardíaca.

AV: átrioventricular; BAV: Bloqueio átrioventricular; BAVT: Bloqueio átrioventricular total; BCRD: Bloqueio completo de ramo direito; BCRE: Bloqueio completo de ramo esquerdo; HBAE: Hemibloqueio anterior esquerdo; IV: Intraventricular; NYHA: *New York Heart Association*

Fonte: Rocha, Ribeiro e Teixeira (2003).

Foram considerados chagásicos os indivíduos com positividade sorológica para *T. cruzi* em duas ou mais técnicas diferentes, incluindo as reações de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta e ELISA, em exames realizados no Laboratório Central do HC-UFMG ou no Laboratório da Fundação Ezequiel Dias. Foram considerados não chagásicos indivíduos sem positividade em qualquer uma das reações sorológicas.

#### **4.4 Critérios de elegibilidade**

##### **4.4.1 Critérios de inclusão**

Os diferentes estudos tinham em comum os critérios de inclusão a seguir:

- Diagnóstico sorológico de infecção por *T. cruzi*, confirmado por dois métodos diferentes (ELISA, imunofluorescência indireta ou hemaglutinação indireta) (BRASIL, 2005).
- Idade entre 18 e 69 anos.
- Pacientes chagásicos com forma indeterminada definidos como: indivíduos assintomáticos, sem disfagia ou constipação intestinal, com eletrocardiograma, radiografia do tórax e ecocardiograma normais.
- Pacientes chagásico com cardiomiopatia, definidos como: indivíduos com sinais clínicos, radiológicos e, principalmente, ecocardiográficos de aumento da área cardíaca, com disfunção da contratilidade global, com ou sem manifestações de insuficiência cardíaca.
- Indivíduos sadios não chagásicos, definidos como: sujeitos que apresentam sorologia negativa para *T. cruzi* em qualquer uma das reações sorológicas: IFI, hemaglutinação indireta, ELISA e que não apresentam qualquer um dos critérios de exclusão, com características demográficas semelhantes às dos pacientes chagásicos.

#### 4.4.2 Critérios de exclusão

Todos os estudos tinham em comum os critérios de exclusão a seguir:

- Hipertensão arterial sistêmica (HAS), definida operacionalmente como: pressão arterial - medida durante o exame físico - de 140/90 mmHg, em mais de uma oportunidade.
- História compatível com doença arterial coronariana, conforme anamnese dirigida.
- Disfunção tireoidiana manifestada por níveis anormais de hormônio estimulante da tireoide (TSH) e da tiroxina (T4) livre, associados ou não a quadro clínico sugestivo de hiper ou hipotireoidismo.
- Diabetes *mellitus* ou tolerância reduzida à glicose, conforme anamnese, dosagem de glicemia em jejum e, se necessário, prova de tolerância oral à glicose (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).
- 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 420 g de etanol - média diária acima de 60 g de etanol (SKINNER *et al.*, 1984).
- Uso de medicamentos anti-inflamatórios.
- Evidências clínicas, eletrocardiográficas e/ou ergométricas de cardiopatia isquêmica.
- Gravidez definida por critérios laboratoriais.
- História ou sinais sugestivos de cardiopatias valvar, congênita, hipertensiva, isquêmica ou idiopática.
- Qualquer outra doença cardiológica ou sistêmica significativa, crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados das provas específicas.
- Anemia significativa, definida arbitrariamente com hemoglobina abaixo de 10 g/dL.

- Distúrbios hidroeletrolíticos, mais 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.
- Uso de marcapasso intracardíaco ou cardiodesfibrador implantável (CDI)

Além disso, para a comparação de variáveis imunológicas e ecocardiográficas em pacientes chagásicos IND e CARD, foram excluídos os que não tinham o ecocardiograma dentro do intervalo de dois anos para pacientes IND, e um ano, para pacientes CARD, contado a partir da data em que foi coletada a amostra de plasma do sangue periférico.

De acordo com os critérios expostos, foram selecionados os pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis não chagásicos que constituíram as amostras utilizadas nos diversos estudos.

#### **4.5 Cálculo do tamanho amostral**

A população de indivíduos em acompanhamento no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas do CTR-DIP - Faculdade de Medicina da UFMG foi distribuída da seguinte forma: 110 pacientes IND, 230 CARD e 50 NI que constituíram o grupo controle. Foi utilizada amostra aleatória estratificada de 266 pacientes com margem de erro de  $\pm 6,1\%$  e poder estatístico de 94%, distribuída conforme a TAB. 1.

TABELA 1 - Distribuição da população e amostra estimada, 2016

<b>Grupo</b>	<b>População</b>	<b>Amostra</b>
NI	50	32
IND	110	93
CARD	230	141
<b>TOTAL</b>	<b>390</b>	<b>266</b>

O desfecho primário foi a associação entre o desenvolvimento e gravidade do acometimento cardíaco na doença de Chagas (determinado pela fração de ejeção, relação E/e' e diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, através do ecocardiograma bidimensional) e o perfil da resposta imune, expresso pela produção das citocinas (IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12) e das quimiocinas (CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5 e CXCL8). Os desfechos secundários foram definidos como: existência de um perfil uniforme de expressão das citocinas e quimiocinas em pacientes com forma indeterminada e cardiomiopatia dilatada; associação entre baixos níveis plasmáticos de IL-10 e IL-17 e altos níveis de citocinas e quimiocinas inflamatórias com o grau de morbidade cardíaca (determinada pela fração de ejeção, relação E/e' e diâmetro diastólico final do ventrículo).

#### 4.6 Definição das variáveis do estudo

No QUADRO 2 é apresentada a natureza das variáveis definidas para o estudo. Elas foram analisadas nos grupos de pacientes com doenças de Chagas, IND e CARD. No grupo controle (NI), foram estudadas todas as variáveis descritas nesse mesmo quadro, com exceção das ecocardiográficas: fração de ejeção do

ventrículo esquerdo, diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e relação E/e'.

QUADRO 2 - Definição das variáveis do estudo, 2016

<b>Variáveis clínicas</b>	<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>
Idade	Contínua	Anos
Sexo	Categórica	Masculino, feminino
Classificação clínica	Categórica	NI, IND, CARD
<i>New York Heart Association (NYHA)</i>	Categórica	I, II, III e IV
<b>Variáveis ecocardiográficas</b>	<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>
Fração de ejeção ventricular esquerda	Contínua	Percentual
Diâmetro diastólico final ventricular esquerdo	Contínua	Milímetros
Relação E/e'	Contínua	Contagem
<b>Variáveis imunológicas</b>	<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>
IL-10	Contínua	pg/mL
IL-17	Contínua	pg/mL
IFN- $\gamma$	Contínua	pg/mL
TNF- $\alpha$	Contínua	pg/mL
IL-6	Contínua	pg/mL
IL-1 $\beta$	Contínua	pg/mL
IL-12	Contínua	pg/mL
CXCL10	Contínua	pg/mL
CCL2	Contínua	pg/mL
CXCL9	Contínua	pg/mL
CCL5	Contínua	pg/mL
CXCL-8	Contínua	pg/mL

\* pg/mL: picograma por mililitro.

#### **4.7 Avaliação clínica**

Realizou-se, ao longo dos anos, avaliação criteriosa de todos os pacientes, pela anamnese e exame físico, dando-se ênfase à ausculta cardíaca com duração de dois minutos, para detecção de extrassistolia em repouso, à caracterização do *ictus cordis* e à pesquisa de sinais de congestão periférica e visceral. Os pacientes foram classificados de acordo com a classe funcional da *New York Heart Association* (NYHA, 1979) e com a classificação clínica da cardiopatia chagásica, adotada no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas (Rocha *et al.*, 2003).

#### **4.8 Eletrocardiograma**

Para realização do eletrocardiograma em repouso empregou-se aparelho do modelo *PAGE WRITER 300 P1*, fabricante PHILIPS. Realizou-se o exame nas 12 derivações habituais, após repouso em decúbito dorsal e interpretado de acordo com as normas da *New York Heart Association* (NYHA, 1979), analisando-se o ritmo e calculando-se a frequência cardíaca. Foram medidos os intervalos PR, onda P, complexo QRS e determinado o eixo cardíaco. Analisaram-se rotineiramente as alterações morfológicas do traçado eletrocardiográfico, com especial caracterização dos distúrbios de condução do estímulo elétrico intraventricular. Utilizou-se o Código de Minnesota modificado para a doença de Chagas (Maguire *et al.*, 1982), para interpretação do eletrocardiograma.

#### **4.9 Ecocardiografia**

Todos os pacientes foram submetidos à avaliação ecocardiográfica, realizada segundo a rotina do Serviço de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital das Clínicas da UFMG.

Os estudos ecocardiográficos foram realizados por ecocardiografistas experientes, com pelo menos dez anos de prática no exame de pacientes chagásicos, utilizando o aparelho ATL PHILIPS HDI 5000, com transdutores de 2,5 e 3,0 MHz para obtenção dos diversos parâmetros avaliados, descritos a seguir. Empregaram-se técnicas de ecocardiografia uni e bidimensional, Doppler pulsado e contínuo guiados por mapeamento do fluxo em cores. Os estudos ao modo M foram guiados pela imagem bidimensional para obtenção das dimensões diastólica e sistólica finais do ventrículo esquerdo e diâmetros do átrio esquerdo e aorta. Todas as medidas foram feitas conforme as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn *et al.*, 1978). Ao ecocardiograma bidimensional foram obtidos cortes padronizados, paraesternal, longitudinal e transverso, além dos cortes apicais em duas, três, quatro e cinco câmaras. Foram feitos cortes intermediários, quando necessário, para avaliação da região apical do ventrículo esquerdo. Foram descritas a morfologia das câmaras cardíacas, textura miocárdica, contratilidade das paredes e possíveis achados de trombos e aneurisma. A contratilidade segmentar foi avaliada por meio do espessamento endocárdico e motilidade das paredes, definindo-se as alterações conforme a observação de hipocinesia, acinesia, discinesia ou aneurisma.

As variáveis ecocardiográficas estabelecidas para correlação clínica e funcional cardiocirculatórias foram as seguintes: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, relação E/e', função sistólica ventricular esquerda a partir do cálculo da fração de ejeção pelo método de Simpson (Lang *et al.*, 2005). O acometimento cardíaco foi definido pelo diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo maior que 55 mm (Baker *et al.*, 1984) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo igual ou inferior a 55% pelo método de Simpson. A descrição das variáveis ecocardiográficas estudadas pode ser observada no QUADRO 2.



#### **4.10 Separação do plasma do sangue periférico**

O sangue dos pacientes que participaram dos estudos foi coletado em tubo *vacutainer* estéril contendo heparina sódica. O sangue total heparinizado foi lentamente adicionado a uma mistura de Ficoll-hypaque (LMS, *Litton Bionetics*, Savannah, Georgia, USA), na proporção de 2:1 em tubos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 400 g durante 40 minutos a 20°C em centrífuga refrigerada Beckman, modelo J-6B (*Beckman Instruments Inc.*, Irvine, USA).

O plasma foi retirado cuidadosamente e transferido para um tubo Falcon, BD de 5 mL. Posteriormente, foi alicotado e armazenado a -70°C em *freezer* do grupo de estudos em doenças de Chagas do LICM do CPqRR/FIOCRUZ. Toda a manipulação foi feita em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar (BBL - *Biological Cabinet*, model 60474, Cockeysville, MD ou Veco, modelo VLFS 12M, Campinas, SP) com soluções e vidrarias também estéreis.

#### **4.11 Quantificação dos níveis plasmáticos das citocinas (IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ e IL-12) e das quimiocinas (CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5 e CXCL8)**

As citocinas e quimiocinas foram quantificadas utilizando-se a metodologia multiplex *Cytometric Bead Array* (CBA), *Becton Dickinson* (BD), que emprega uma mistura de esferas de poliestireno conjugadas com anticorpos específicos para as citocinas humanas, com intensidades de fluorescência distintas, detectados nos canais FL3 e FL4 do citômetro de fluxo. Essa metodologia (Chen *et al.*, 1999) permite a avaliação simultânea de diversas moléculas solúveis no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. As amostras de quimiocinas foram diluídas na proporção de 1:10 para a leitura no citômetro de fluxo. Foram utilizados os três diferentes kits para a quantificação dos níveis plasmáticos de

citocinas e quimiocinas: *Human Inflammatory Cytokine Kit*, *Human Th1/Th2/Th17 Kit* e *Human chemokine Kit* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Para a reação, 25 µL da mistura de esferas de captura, marcadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina ou quimocina estudada, foram transferidos para tubos de 12x75 mm destinados ao controle negativo e às amostras a serem testadas. Em seguida, 25 µL do diluente G e das amostras foram adicionados aos seus respectivos tubos. Adicionou-se 18 µL do coquetel de anticorpos monoclonais humanos marcados com fluocromo PE (reagente de detecção PE). Os tubos foram incubados por três horas, à temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 µL da solução tampão fosfato salínico (PBS) e centrifugadas a 1.300 rotações por minuto (rpm) por sete minutos a 18°C. Cuidadosamente, o sobrenadante foi aspirado e descartado, restando-se aproximadamente 100 µL em cada tubo. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Após leitura, foi analisado o perfil de citocinas e quimiocinas seguindo-se o protocolo proposto pelo fabricante utilizando-se o FCAP array *software* (BD Biosciences). O FCAP array *software* versão 1 (Soft Flow, Inc.) faz a seleção automática da região das esferas de captura em gráficos de dispersão frontal (tamanho) *versus* dispersão lateral (granulosidade). Em seguida, separam-se as esferas em função da intensidade da FL4 e analisa-se o deslocamento das esferas em função da intensidade da FL3 em gráficos bidimensionais de FL3 *versus* FL4. A ligação da citocina ou quimiocina presente na amostra de interesse pode ser evidenciada pelo deslocamento do conjunto de esferas para a região de maior intensidade de fluorescência em relação ao tubo-controle negativo. Os valores correspondentes à intensidade média de fluorescência FL2 na escala logarítmica foram utilizados como unidade de análise semiquantitativa para cada citocina e quimiocina avaliada. A quantificação em pg/mL de cada citocina ou quimiocina foi baseada em uma curva padrão, realizada com diluições conhecidas, o que

possibilitou a construção de um gráfico de intensidade média de fluorescência versus pg/mL. A curva padrão foi determinada utilizando-se a equação de regressão do quinto parâmetro logístico ( $\log I = D + (A - D) / (1 + (\log CC - E) / C)^B$ ),  $R^2 = 99.99\%$ . Os resultados foram baseados na curva padrão e expressos como pg/mL.

#### 4.12 Análise de bioinformática

As análises de algoritmos supervisionados, *Support Vector Machine (SVM)* e *k-Nearest Neighbor (k-NN)*, e agrupamento hierárquico não supervisionado foram realizadas utilizando-se a Plataforma GenePattern. O modo de validação cruzada no *k-NN* foi executado com  $k = 3$ , teste T estatístico para seleção de características, e medida da distância Euclídiana. Empregou-se no agrupamento hierárquico a medida da distância Euclídiana e o agrupamento *pair wise complete-linkage*.

Desenvolveram-se algoritmos de aprendizagem de máquina afim de construir um sistema no qual possa aprender a partir de experimentos prévios. Todos os testes foram aplicados com base nos níveis de doze marcadores distintos (IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5 e CXCL8) para cada indivíduo incluído no estudo. Realizou-se também análise não supervisionada com o objetivo de agrupar os indivíduos com perfil de expressão semelhante de citocinas e quimiocinas plasmáticas.

#### 4.13 Análise estatística

Pacientes infectados pelo *T. cruzi* foram agrupados como: forma indeterminada (IND) e cardiomiopatia dilatada (CARD). Constituíram o grupo controle indivíduos saudáveis não infectados (NI), provenientes de área não

endêmica para a doença de Chagas e exibindo testes sorológicos negativos para a doença. As comparações entre os grupos – NI, IND e CARD – foram feitas por meio do teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni ( $5\% \div 3$ ). Para verificar a relação entre os dados imunológicos e as variáveis marcadoras de morbidade cardíaca chagásica, foram calculados coeficientes de correlação de Spearman. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o *SPSS statistical software*, versão 18.0 (*SPSS Inc.*, Chicago, Illinois). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o *GraphPad Prism software*, versão 5.0 (San Diego, CA, USA). Todos os testes foram realizados no nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ).

#### **4.14 Considerações éticas**

O projeto contou com a anuência de todas as instâncias institucionais da Faculdade de Medicina da UFMG, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG em 16 de novembro de 2011, conforme Parecer ETIC nº 502/11 (ANEXO A), cujo registro no COEP é CAAE – 0502.0.203.000-11.

O projeto também foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR/FIOCRUZ e aprovado conforme protocolo CEP – CPqRR nº. 15/2011 (ANEXO B).

Todos os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa de forma voluntária e, após esclarecimento, quanto ao objetivo e métodos do estudo. Os procedimentos foram precedidos da garantia da clara compreensão do conteúdo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e da sua assinatura em duplicata pelos sujeitos da pesquisa. Após assinado, uma via do TCLE foi entregue para cada um deles e uma via ficou em poder do pesquisador responsável (APÊNDICES A e B).

Foram respeitadas as condições éticas pertinentes ao protocolo, seguidos rigorosamente os princípios enunciados na Declaração de Helsink II, de 1975, revisada em 1983, e do Ministério da Saúde do Brasil/Comitê Nacional Brasileiro de Ética em Pesquisa e da Resolução nº. 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde para pesquisa em seres humanos.

#### **4.15 Pesquisa bibliográfica**

As pesquisas bibliográficas foram realizadas no período entre maio de 2015 e fevereiro de 2016, a partir de consulta às bases de dados Literatura Internacional em Ciências da Saúde (PubMed), compilada pela *National Library of Medicine* dos Estados Unidos da América, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Scientific Electronic Library Online (SCIELO). A definição das palavras-chave foi realizada mediante consulta aos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e Medical Subject Headings (MeSH), disponíveis na Internet.

Utilizaram-se os seguintes descritores na base de dados PubMed: *Chagas disease, morbidity, immune system, cytokines, chemokines, interleukin-10, interleukin-17, interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-1beta, interleukin-12, chemokine CXCL10, chemokine CCL2, chemokine CXCL9, chemokine CCL5, chemokine CXCL8*. Nas bases de dados LILACS e SCIELO utilizaram-se os seguintes descritores: doença de Chagas, morbidade, etiologia, citocinas, quimiocinas, interleucina-10, interleucina-17, interferom-gama, fator alfa de necrose tumoral, interleucina-6, interleucina-1 beta, interleucina-12, quimiocina CXCL10, quimiocina CCL2, quimiocina CXCL9, quimiocina CCL5, quimiocina CXCL8. As palavras-chave foram pareadas utilizando-se os seguintes operadores de pesquisa: aspas, parênteses, “AND” e “OR”. Foram utilizados como filtros: artigos indexados na área de interesse, em português, espanhol e inglês, no

período dos diversos estudos aqui relatados. Outras referências complementares de interesse foram obtidas em teses e livros especializados.

A elaboração das referências seguiu as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para elaboração de trabalhos acadêmicos (Norma Brasileira - NBR 14724) (ABNT, 2011). Para as citações e lista de referências, utilizou-se o *software EndNote X7 17.0.1* que adota as normas NBR 10520 e NBR 6023 (ABNT, 2002) da mesma instituição com o sistema de citação autor-data e, por essa razão, as referências foram organizadas em ordem alfabética. Para os artigos, adotou-se o formato específico de cada periódico com citações e referências organizadas utilizando-se também o referido *software*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Manuscrito I

# The Role of Interleukin 17-Mediated Immune Response in Chagas Disease: High Level is Correlated with Better Left Ventricular Function

Giovane Rodrigo [Sousa]<sup>1</sup>, Juliana Assis Silva [Gomes]<sup>1,2</sup>, Marcos Paulo Souza [Damasio]<sup>2#a</sup>, Henrique Silveira [Costa]<sup>1</sup>, Maria Carmo Pereira [Nunes]<sup>1</sup>, Nayara Ingrid [Medeiros]<sup>3</sup>, Rafaelle Christine Gomes [Fares]<sup>3#b</sup>, Ana Thereza [Chaves]<sup>1</sup>, Rodrigo [Corrêa-Oliveira]<sup>3,4\*</sup>, Manoel Otávio da Costa [Rocha]<sup>1</sup>

**1** Postgraduate Course of Infectious Diseases and Tropical Medicine, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **2** Laboratory of Cell-Cell Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **3** Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **4** National Institutes of Science and Technology Tropical Diseases (INCT-DT), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>#a</sup> Current address: Division of Cell Signalling and Immunology, School of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, UK. <sup>#b</sup> Current address: United States Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, Silver Spring, MD, USA.

\* [giovane.sousa@gmail.com](mailto:giovane.sousa@gmail.com)

## Abstract

Interleukin 17 (IL-17) has been associated with protective rather than pathogenic response in Chagas disease (ChD). However, it is not completely established whether IL-17-mediated immune response is correlated with morbidity in ChD. The aim of this study was to evaluate the plasma IL-17 levels in patients with the indeterminate and severe cardiac forms of chronic ChD and whether IL-17-mediated immune response is correlated with patients' left ventricular function. Plasma concentrations of IL-17 were measured by BD Cytometric Bead Array (CBA) in 234 patients with positive specific serology for *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) grouped as indeterminate (IND) and cardiac (CARD) forms, and compared with 32 healthy individuals, 16 males (50%), ranging from 27 to 58 years of age (mean of  $39.38 \pm 10.08$ ), that were also included as a control group (non-infected [NI]). Mean age of ChD patients was  $46.83 \pm 9.97$  years (range 23-69 years), and 119 (51%) were male. The IND group included 93 asymptomatic patients, with ages ranging from 27 to 69 years (mean of  $43.49 \pm 8.80$ ). The CARD group included 141 patients, with ages ranging from 23 to 67 years (mean of  $49.03 \pm 10.12$ ). The IND group presented substantially higher levels of IL-17, median of 26.45 (8.06–48.33) as compared to the CARD group, median of 14.45 (4.98–34.54) ( $P < 0.0001$ ), and the NI group, median of 10.78 (6.23–22.26) ( $P < 0.0001$ ). The data analysis demonstrated that the IND group comprises a significantly higher frequency ( $P < 0.001$ ) of high IL-17 producers (53.76% 50/93) than do the other groups. A significant correlation was verified between lower levels of IL-17 and worse cardiac function expressed by lower left ventricular ejection fraction (LVEF) and higher left ventricular diastolic diameter (LVDD) as well as higher ratio of the early diastolic transmitral flow velocity to early diastolic mitral annular velocity ( $E/e'$ ) in both groups. This study demonstrates that high level of IL-17 is correlated with better left ventricular function in human ChD. Our data suggest that IL-17 may play an important immunomodulatory role in the chronic phase of ChD and might be involved in protection against myocardial damage.

**Keywords:** interleukin 17; cytokines; immune response; immunity; Chagas disease; Chagas cardiomyopathy; cardiomyopathies; left ventricular function



## Introduction

The immunopathogenesis of Chagas disease (ChD) is complex and not yet fully understood [1]. Interleukin 17 (IL-17) is a proinflammatory cytokine that contributes to host protection against a range of infectious pathogens by inducing the recruitment of neutrophils and secretion of inflammatory mediators [2, 3]. Prior literature has suggested an important role for IL-17 in the resolution of infection with the protozoan parasite *T. cruzi* [4-6]. Moreover, preliminary data both from experimental [7] and human *T. cruzi* infection studies [8-10] have indicate that this cytokine is associated with protective rather than pathogenic responses.

Studies on IL-17 in human ChD are limited and have usually employed small sample size [8-11]. In addition, only in one study, correlation analysis was performed between this cytokine and parameters of cardiac function such as LVEF and LVDD [10]. Conflicting evidence exists regarding the role of IL-17-mediated immune response in human ChD. Given these findings, this study was designed to evaluate the plasma IL-17 levels in patients with the indeterminate and severe cardiac forms of ChD and to assess whether IL-17-mediated immune response would correlate with patients' left ventricular function.

These clinical forms were selected to this study since they represent extremes of the wide clinical spectrum of ChD. The indeterminate form of ChD is defined by the presence of *T. cruzi* infection, absence of symptoms, and of electrocardiographic and radiologic abnormalities [12]. In contrast, Chagas cardiomyopathy is characterized by chronic myocarditis that involves all cardiac chambers and damage to the conduction system [13]. This most severe form of ChD manifests as three frequent syndromes that can co-occur in an individual patient: heart failure, cardiac arrhythmia, and thromboembolism [14]. These patients are of special interest for studies involving the natural development of the disease and the possible determinants of clinical outcome. The identification of non-invasive markers related to morbidity and prognosis may allow the recognition of subgroups of patients with potential to progress toward the severe forms of ChD, which should require special attention and specific therapeutic approaches in order to prevent or delay the unfavorable outcome of these patients. In this study, we gathered data from ChD patients, aged 23 to 69 years and analysed the

possible relationship between their plasma IL-17 levels and left ventricular function.

## Materials and Methods

### Study population

This study comprises 240 patients with ChD from endemic areas within the state of Minas Gerais, Brazil, who were identified and selected at the Referral Outpatient Center for Chagas Disease at the Clinical Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil. Six patients (2.5%) were excluded from this study: 2 with indeterminate form of ChD (IND) and 4 with Chagas cardiomyopathy (CARD), since the plasma IL-17 levels did not reached the detection limit provided by manufacturers for IL-17 using the BD human Cytometric Bead Array (CBA) assay. A total of 234 patients with positive specific serology for *T. cruzi*, in the chronic phase of the disease fulfilled eligibility criteria and were included in the study. The study protocol received the approval by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (protocol COEP-ETHIC 502/11) and Centro de Pesquisas René Rachou (protocol CEPESH-CPqRR 15/2011). All enrolled patients gave written informed consent prior to the inclusion in the study.

Inclusion criteria were the diagnosis of IND defined as asymptomatic individuals, in sinus rhythm, with no significant alterations in electrocardiography, chest radiograph, and echocardiogram, and diagnosis of CARD characterized by the echocardiographic finding of a dilated left ventricle with impaired ventricular systolic function. LVEF, LVDD, and E/e' ratio were used as variables of the left ventricular function, where LVEF <55% and LVDD/body surface area  $\geq$ 31mm were used to define CARD patients [11].

Healthy individuals from a non-endemic area for ChD and showing negative serological tests for the infection were included as a control group, NI. None of the patients were undergoing etiological treatment nor had been previously treated for *T. cruzi* infection. Individuals with any other chronic inflammatory disease, thyroid dysfunction, valvular heart disease, coronary artery disease, systemic arterial hypertension, chronic obstructive pulmonary disease, hydroelectrolytic disorders,

renal insufficiency, diabetes mellitus, alcoholism, and other infectious diseases were excluded from this study.

## **Multiplexed bead-based immunoassay**

A BD CBA Human Th1/Th2/Th17 cytokine Kit (Catalog No. 560484; Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) was used to quantify IL-17 concentration in plasma, following manufacturer instructions. The data were acquired in a BD FACSCalibur flow cytometry system (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyses performed using BD FCAP Array v3.0 software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The standard curve was determined using a five-parameter logistic (5-PL) equation. The results were based on standard concentration curve and expressed as picogram per milliliter (pg/mL).

## **Statistical analyses**

Statistical comparative analyses were performed in groups of two between the NI, IND, and CARD groups, using the non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test, together with the Bonferroni correction (significance level,  $0.05/3 = 0.0167$ ). Categorical data were presented as numbers and percentages, and continuous data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median and interquartile range (25%-75%), as appropriate.

SPSS statistical software, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) was used for all analyses. The graphs were prepared using GraphPad Prism software, version 5.0 (San Diego, CA, USA). All tests were performed considering a significance level of 5% ( $\alpha = 0.05$ ).

## **Results**

### **Clinical features**

The mean age of ChD patients was  $46.83 \pm 9.97$  years, and 51.4% were male. The IND group included 93 asymptomatic patients, with ages ranging from 27 to 69 years (mean of  $43.49 \pm 8.80$ ). The CARD group included 141 patients, with ages ranging from 23 to 67 years (mean of  $49.03 \pm 10.12$ ). Most CARD

patients (85.8%) were in NYHA functional class I and II. Moreover, 32 healthy individuals, 16 males (50%), ranging from 27 to 58 years of age (mean of  $39.38 \pm 10.08$ ), were also included as the NI group. The demographic and clinical characteristics of ChD patients are summarized in Table 1.

**Table 1. Demographic and clinical characteristics of the Chagas disease patients.**

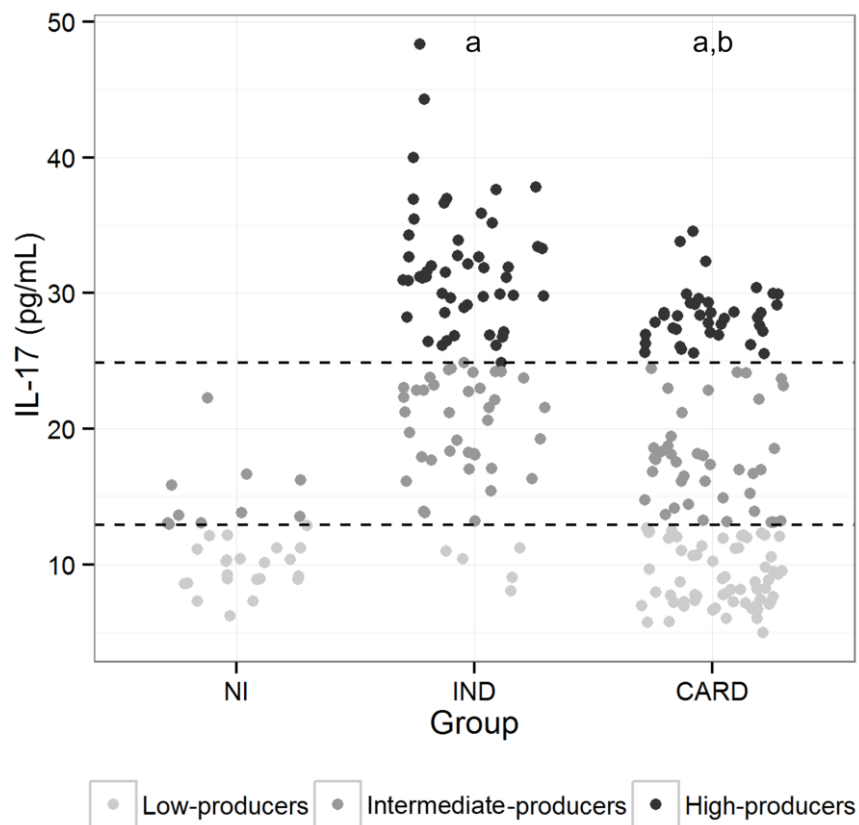
Variables	IND group (n = 93)	CARD group (n = 141)	p value
Age, yrs	43.49 $\pm$ 8.80	49.03 $\pm$ 10.12	0.082
Male, n/%	40 (43)	85 (60.3)	0.012*
BSA, m <sup>2</sup>	1.73 (1.65, 1.84)	1.68 (1.55, 1.77)	0.054
HR, bpm	68 (62, 75)	64 (59.75, 72)	0.039*
SBP, mmHg	120 (110, 130)	110 (100, 120)	0.002*
DBP, mmHg	82 (80, 90)	70 (60, 80)	0.001*
LVDD, mm	48 (45, 50)	63 (58.5, 68)	0.000*
LVEF, %	66 (63, 69)	39 (29, 47)	0.000*
E/e' ratio	9 (7, 10)	10 (6, 15.5)	0.009*

Values are expressed as mean and standard deviation (mean  $\pm$  SD), median (interquartile range) or absolute number (percentage). BSA, body surface area; HR, heart rate; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure LVDD, left ventricular diastolic diameter; LVEF, left ventricular ejection fraction; E/e'ratio, ratio of the early diastolic transmitral flow velocity to early diastolic mitral annular velocity. \**P*-value < 0.05 for comparison between IND and CARD groups.

## **Plasma IL-17 levels are associated with morbidity in Chagas disease**

To determine whether the levels of IL-17 are associated with morbidity in ChD, the concentration of this cytokine was evaluated in the plasma from IND and CARD patients as well as healthy individuals. Differences among the three groups were observed for IL-17 (*P* < 0.0001). The IND group presented substantially higher levels of IL-17, median of 26.45 (8.06–48.33) as compared to the CARD group, median of 14.45 (4.98–34.54) (*P* < 0.0001), and the NI group, median of

10.78 (6.23–22.26) ( $P < 0.0001$ ) (Fig 1). To establish the IL-17 cut-off that would permit the identification of patients with IND and CARD forms of ChD, an analysis was performed that allows a division of the individuals into three categories: low (4.98–12.69 pg/mL), intermediate (12.88–24.88 pg/mL), and high (24.89–48.33 pg/mL) IL-17 producers. To that end, these three groups were identified based on the detailed analysis of individual levels of IL-17 obtained for NI, IND, and CARD groups; a statistical method based in tertiles [15] was employed to determine the cut-off for IL-17 plasma levels, as shown in Fig 1. The data analysis demonstrated that the IND group comprises a significantly higher frequency of intermediate (40.86% 38/93) and high (53.76% 50/93) IL-17 producers than do the other groups ( $P < 0.001$ ) (Fig 1). In contrast, most of the CARD patients displayed values of IL-17 levels that are below the cut-off for low IL-17 producers, being significantly lower than IND patients (5.37%, 5/93) ( $P < 0.001$ ), while approximately 28.36% (40/141) and 27.65% (39/141) of CARD patients were identified as intermediate and high IL-17 producers, respectively (Fig 1). None of the individuals were identified as high IL-17 producers in the NI group (Fig 1).

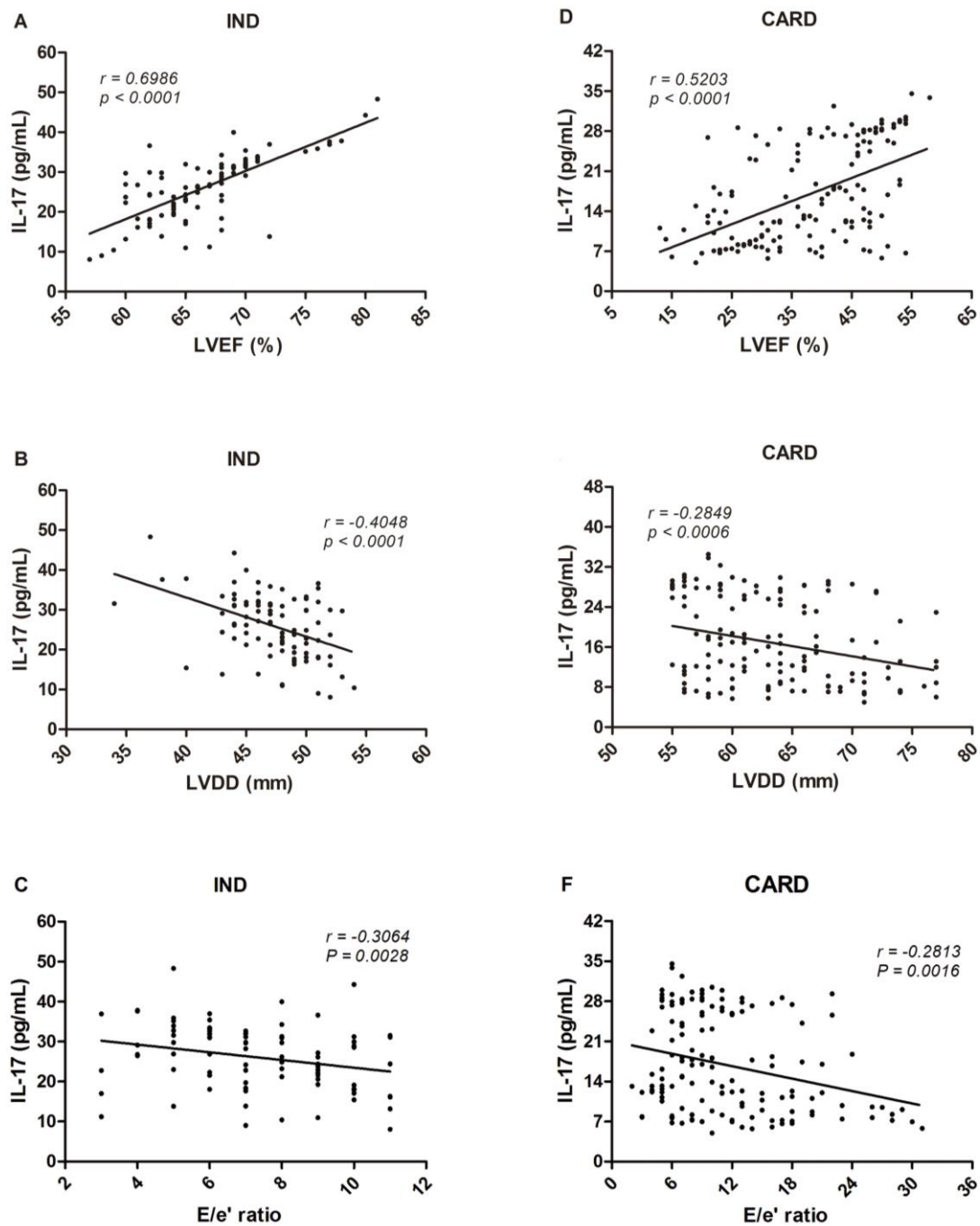


**Fig 1. Analyses of plasma IL-17 levels in the study groups.** Representative scatter plot graph of plasma IL-17 used to establish the cut-off to define low, intermediate, and high cytokine producers. Low IL-17 producers were defined by values of lower than the first tertile. Intermediate IL-17 producers were defined by values equal to or lower than the second tertile, while high IL-17 producers were defined by values higher than or equal to the second tertile [18]. The results were expressed by pg/mL. Results were considered significant with a  $P$ -value  $<0.05$ .

## High IL-17 Levels Correlated With Better Left Ventricular Function in Chagas Disease

In order to investigate the existence of association between IL-17 levels and left ventricular function in ChD, correlation analysis was performed between the plasma IL-17 levels in either IND or CARD groups and cardiac involvement expressed by parameters of systolic and diastolic ventricular function. A significant correlation was verified between the levels of IL-17 and cardiac morbidity expressed by the echocardiographic variables LVEF and LVDD as well as E/e'

ratio in both groups (Fig 2). When the association between higher levels of IL-17 and higher LVEF was investigated in the IND group, a significant positive correlation was observed ( $r = 0.6986$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig 2A). In contrast, a significant negative correlation could be found between higher levels of IL-17 and lower LVDD in the same group ( $r = -0.4048$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig 2B). Plasma IL-17 levels were also inversely correlated with E/e' ratio in the IND group (Fig 2C). A significant positive correlation was identified when IL-17 levels were compared with LVEF in the CARD group ( $r = 0.5203$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig 2D). Conversely, negative correlation was observed between lower levels of IL-17 and higher LVDD in CARD group ( $r = -0.2849$ ,  $P = 0.0006$ ) (Fig 2E). Similar results could be found when comparing lower levels of IL-17 and higher E/e' ratio in the same group ( $r = -0.2813$ ,  $P = 0.0016$ ) (Fig 2F).



**Fig 2. Correlation analysis between plasma IL-17 levels and echocardiographic parameters of left ventricular function.** Correlation analysis was performed between plasma IL-17 levels and parameters of left ventricular function (LVEF, LVDD, and E/e' ratio) in the IND (n = 93, A, B, and C, respectively) and CARD (n = 141, D, E, and F, respectively) groups. The analysis was performed using the Spearman correlation coefficient, and results were considered significant when  $P$ -value  $< 0.05$ . Significant differences are indicated in each graph together with the  $r$  value.



## Discussion

The principal findings of this study were: (a) IND patients, when compared to CARD and NI individuals, present higher plasma levels of IL-17; (b) IND group contains a significantly higher frequency of high IL-17 producers than do the other groups; and (c) high plasma levels of IL-17 is associated with better left ventricular function.

The present study included quantitative variables to assess the left ventricular function and correlated them with plasma IL-17 expression in patients with ChD. In patients with chronic Chagas cardiomyopathy, impairment of left ventricular filling and systolic dysfunction usually coexist [16-18] and are consistent predictors of functional capacity [19, 20] and mortality [21] in this severe form of ChD. A previous study showed that patients with mild or moderate systolic dysfunction, the E/e' ratio (an important marker of left ventricular filling pressure) of more than 15 was powerful in predicting prognosis in patients with Chagas cardiomyopathy [22].

Higher levels of IL-17 in the IND group compared to the NI group might be explained by a possible effect of *T. cruzi* infection inducing immune response even in these asymptomatic patients. This result is in agreement with findings from previous studies [8-10]. A significant frequency of IND patients presented high levels of IL-17, whereas most of the CARD patients expressed low levels of this cytokine. Although, low and high producers of IL-17 were observed in both groups. The importance of this differential expression throughout the chronic phase of ChD and to the disease outcome remains unknown. A possible explanation, for the broad distribution range of IL-17 levels produced by CARD patients, could be the difference in the expression of immune response determined by different host's genetic patterns. Furthermore, it could be hypothesized that lower IL-17 producers in the CARD group would develop an earlier or worse left ventricular function. On the other hand, higher IL-17 producers in the same group probably would display later and less intense cardiac morbidity. In contrast, lower IL-17 producers in the IND group would be those likely to develop myocardial damage, whereas those that show higher levels of this cytokine would tend to present a later cardiac involvement or remain asymptomatic. In this context, it is seems reasonable to consider that intermediate IL-17 producers might present an expression profile

resulting of balanced immune response controlled by regulatory mechanisms such as Foxp3+CD25(high)CD4+ regulatory T cells previously demonstrated by our group [8]. Nevertheless, the disease progression and clinical future of those patients has not been established yet and probably involve multiple factors.

The findings from prior studies have suggested a possible protective role of IL-17 in experimental infection models [4] and in human ChD [10]. In order to better understand the role of IL-17 in *T. cruzi* infection, IL-17A<sup>-/-</sup> mice and anti-IL-17 treatment were used as strategy [4, 5]. In this study, it was verified earlier mortality of IL-17A<sup>-/-</sup> mice when compared to mice controls treated with anti-IL-17. These studies suggest that IL-17 would be relevant for the balance of immune response and important for parasite control during the chronic phase of the disease [1].

We also addressed the question of whether IL-17-mediated immune response is correlated with patients' left ventricular function. Notably, a significant correlation was observed between the plasma IL-17 levels in either IND or CARD groups and cardiac involvement expressed by variables of systolic (LVEF) and diastolic (LVDD and E/e' ratio) ventricular function. Overall, these data showed that high plasma levels of IL-17 are associated with better left ventricular function. Thus, it is tempting to speculate that IL-17 may display a protective role in the chronic phase of ChD. While our data suggest a relation between high IL-17 levels and better cardiac function in human ChD, this and previous studies in patients with ChD were cross-sectional and could not establish causality between heart damage protection and IL-17 expression. Our longitudinal study cohort in progress provide an opportunity to investigate the influence of IL-17 expression on disease progression and clinical outcome since multiple samples are available from the same patients and healthy control subjects without ChD.

IL-17 has been described as a cytokine secreted by T helper 17 cells (Th17). Moreover, other cells were recognized as IL-17 sources, such as monocytes, neutrophils, and natural killer T (NKT) cells [2, 3, 23]. Nonetheless, Bermejo *et al.* showed that B cells are the principal source of IL-17 after infection with the extracellular parasite *T. cruzi* and that the B cells produce IL-17 independently of ROR $\gamma$ T, which is considered the main transcription factor involved with Th17 differentiation [6]. Fibroblasts, macrophages, neutrophils, B and T cells are considered target of this cytokine [3]. Once IL-17 binds to its

receptor, it induces the secretion of inflammatory cytokines (TNF, IL-1 and IL-6) and chemokines (CXCL1, CXCL5, IL-8, CCL2, and CCL7). Like many cytokines, IL-17 may play a role in tumor development, encephalomyelitis, arthritis, systemic lupus erythematosus, inflammatory bowel disease, sepsis, and allergic diseases [23, 24]. In contrast to pathogenic roles of IL-17 in autoimmune and chronic inflammatory diseases, this cytokine promotes host defense against pathogens at epithelial and mucosal tissues which include the skin, lung, and intestine [2, 3, 23].

IL-17 induces the expression of several proinflammatory chemokines and cytokines through activation of NF- $\kappa$ B, MAPKs and C/EBPs cascades [24, 25, 26]. Furthermore, other studies have suggested that IL-17 can activate JAK–PI3K and JAK–STAT pathways [27, 28]. However, how IL-17 contributes to the activation of these pathways is unclear. Hence, further investigations will be necessary to identify the signaling pathway and the effects of IL-17 in distinct cell populations such as fibroblasts, CD8+ T cells, macrophages, and NKT cells. It is also important to evaluate the signaling induced by IL-17 considering the presence of antigens and different gene polymorphisms.

In this study, we included a large and homogenous cohort of ChD patients who have not been previously treated for *T. cruzi* infection and performed a strategic analysis to establish an appropriate determination of cut-off edge that allows the division of IL-17 levels in three categories [29]. This method of analysis dichotomize low and high producers of IL-17 (extremes of expression) and express better a biological phenomenon that presents a wide dispersion.

In conclusion, the data suggest that IL-17 may play an important immunomodulatory role in the chronic phase of ChD and might be involved in protection against myocardial damage. However, there are still many open questions pertaining the role of IL-17 in *T. cruzi* infection [30] and further studies will be necessary to address them. To elucidate the role of IL-17 in the development or control of chronic Chagas cardiomyopathy, we are now also investigating whether lower levels of IL-17 are related to higher morbidity, expressed by arrhythmogenic substrates, in CARD patients and either by the presence of subclinical alterations or arrhythmogenicity in IND patients. Understanding the role of this cytokine may provide useful information for better comprehension of the pathogenesis of ChD and contribute to the proper management and treatment of the patients.

## Acknowledgments

We thank all the personal from the Division of Echocardiography, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, and the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology as well as the Flow Cytometry Platform, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, for their technical assistance. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health – PDTIS – FIOCRUZ for the use of its facilities. We are thankful to the CNPq and FAPEMIG funding agencies in Brazil for their financial support: JASG, MCPN, RCO and MOCR are CNPq fellows.

## References

1. Dutra WO, Menezes CA, Magalhaes LM, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 2014; 36(8):377-87. doi: 10.1111/pim.12107 PMID: 24611805
2. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(8):556-67. doi: 10.1038/nri2586 PMID: 19575028
3. Gaffen S. IL-17 receptor composition. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16(1):4. doi: 10.1038/nri.2015.2 PMID: 26593717
4. Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimano Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2010; 185(2):1150-7. doi: 10.4049/jimmunol.0900047 PMID: 20562260
5. da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(2):e604. doi: 10.1371/journal.pntd.0000604 PMID: 20169058
6. Bermejo DA, Jackson SW, Gorosito-Serran M, Acosta-Rodriguez EV, Amezcua-Vesely MC, Sather BD, et al. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR $\gamma$  and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol.* 2013; 14(5):514-22. doi: 10.1038/ni.2569 PMID: 23563688

7. Tosello Boari J, Amezcua Vesely MC, Bermejo DA, Ramello MC, Montes CL, Cejas H, et al. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4):e1002658. doi: 10.1371/journal.ppat.1002658 PMID: 22577359
8. de Araujo FF, Correa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RC, et al. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology.* 2012; 217(8):768-77. doi: 10.1016/j.imbio.2012.04.008 PMID: 22672991
9. Guedes PM, Gutierrez FR, Silva GK, Dellalibera-Joviliano R, Rodrigues GJ, Bendhack LM, et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(4):e1630. doi: 10.1371/journal.pntd.0001630 PMID: 22545173
10. Magalhaes LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis.* 2013; 207(4):661-5. doi: 10.1093/infdis/jis724 PMID: 23204182
11. Perez AR, Silva-Barbosa SD, Berbert LR, Revelli S, Beloscar J, Savino W, et al. Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive forms of chronic Chagas disease. *J Neuroimmunol.* 2011; 235(1-2):84-90. doi: 10.1016/j.jneuroim.2011.03.010 PMID: 2149693
12. Rocha MO, Ribeiro AL, Teixeira MM. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci.* 2003; 8:e44-54. doi: 10.2741/926 PMID: 12456332
13. Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62(9):767-76. doi: 10.1016/j.jacc.2013.05.046 PMID: 23770163
14. Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol.* 2012; 9(10):576-89. doi: 10.1038/nrcardio.2012.109 PMID: 22847166
15. Altman DG. *Practical statistics for medical research.* 1st ed. London: Chapman & Hall; 1991.

16. Acquatella H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation*. 2007; 115(9):1124-31. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627323 PMID: 17339570
17. Rocha MO, Nunes MC, Ribeiro AL. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 Suppl 1:159-66. doi: 10.1590/S0074-02762009000900022 PMID: 19753471
18. Nunes MC, Barbosa MM, Ribeiro AL, Colosimo EA, Rocha MO. Left atrial volume provides independent prognostic value in patients with Chagas cardiomyopathy. *J Am Soc Echocardiogr*. 2009; 22(1):82-8. doi: 10.1016/j.echo.2008.11.015 PMID: 19131007
19. Lima MM, Nunes MC, Rocha MO, Beloti FR, Alencar MC, Ribeiro AL. Left ventricular diastolic function and exercise capacity in patients with Chagas cardiomyopathy. *Echocardiography*. 2010; 27(5):519-24. doi: 10.1111/j.1540-8175.2009.01081.x PMID: 20412275
20. Lima MM, Nunes MC, Nascimento B, Costa HS, Sousa LA, Teixeira AL, et al. Improvement of the functional capacity is associated with BDNF and autonomic modulation in Chagas disease. *Int J Cardiol*. 2013; 167(5):2363-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.11.055 PMID: 23232458
21. Nunes MC, Reis RC, Colosimo EA, Ribeiro AL, Barbosa FB, da Silva JL, et al. Risk estimation approach in Chagas disease is still needed. *Int J Cardiol*. 2011; 147(2):294-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.12.044 PMID: 21194765
22. Nunes MP, Colosimo EA, Reis RC, Barbosa MM, da Silva JL, Barbosa F, et al. Different prognostic impact of the tissue Doppler-derived E/e' ratio on mortality in Chagas cardiomyopathy patients with heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2012; 31(6):634-41. doi: 10.1016/j.healun.2012.01.865 PMID: 22305956
23. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011; 34(2):149-62. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.012 PMID: 21349428
24. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006; 314(5804):1461-3. doi: 10.1126/science.1135245 PMID: 17068223

25. Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122(11):487-511. doi: 10.1042/CS20110496 PMID: 22324470
26. Garg AV, Ahmed M, Vallejo AN, Ma A, Gaffen SL. The deubiquitinase A20 mediates feedback inhibition of interleukin-17 receptor signaling. *Sci Signal*. 2013; 6(278):ra44. doi: 10.1126/scisignal.2003699 PMID: 23737552
27. Song X, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine*. 2013; 62(2):175-82. doi: 10.1016/j.cyto.2013.03.014 PMID: 23557798
28. Song X, Dai D, He X, Zhu S, Yao Y, Gao H et al. Growth Factor FGF2 Cooperates with Interleukin-17 to Repair Intestinal Epithelial Damage. *Immunity*. 2015; 43(3):488-501. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.024 PMID: 26320657
29. Sousa GR, Gomes JA, Fares RC, Damasio MP, Chaves AT, Ferreira KS, et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PLoS One*. 2014; 9(3):e87082. doi: 10.1371/journal.pone.0087082 PMID: 24603474
30. León B, Lund FE. IL-17-producing B cells combat parasites. *Nat Immunol*. 2013; 14(5):419-21. doi: 10.1038/ni.2593 PMID: 23598388

## 5.2 Manuscrito II

### **Pattern of cytokine and chemokine expression throughout the chronic phase of Chagas disease**

G. R. Sousa<sup>1#a</sup>, J. A. Gomes<sup>1,2</sup>, M. P. Damasio<sup>2#a</sup>, M. C. P. Nunes<sup>1</sup>, G. C. Oliveira<sup>5</sup>, F. S. Pais<sup>5</sup>, N. I. Medeiros<sup>3</sup>, H. S. Costa<sup>1</sup>, R. C. Fares<sup>3#b</sup>, R. Corrêa-Oliveira<sup>3,4</sup>, M. O. C. Rocha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Course of Infectious Diseases and Tropical Medicine, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Cell–Cell Interactions, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>4</sup>National Institutes of Science and Technology Tropical Diseases (INCT-DT), Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>5</sup>Genomics & Computational Biology Group, René Rachou Research Center, FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>#a</sup>Current address: Division of Cell Signalling and Immunology, School of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, United Kingdom. <sup>#b</sup>Current address: United States Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research - Silver Spring, MD, United States of America.

Corresponding author: R. Corrêa-Oliveira, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ. Avenida Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil (correa@cpqrr.fiocruz.br).



## **Abstract**

### **Background**

Cytokines and chemokines play an important role in the polarization of the immune response; however, their patterns of expression throughout the chronic phase of ChD have never been elucidated. This study was designed to identify a composite set of biomarkers associated with morbidity and to investigate the pattern of cytokine and chemokine expression throughout the chronic phase of ChD.

### **Methods and results**

It is one of the largest analyses involving set samples from a cohort of patients grouped as indeterminate form (IND, n=93) and Chagas cardiomyopathy (CARD, n=141). Healthy individuals (n=32) were also included as a control group (non-infected [NI]). Mean age of ChD patients was  $46.83 \pm 9.97$  years (range, 23-69 years), and 119 (51%) were male. Exploratory analysis of cytokine and chemokine networks in the CARD group revealed significant positive correlations amongst  $\text{IFN-}\gamma \leftrightarrow \text{CXCL10}$  and  $\text{CXCL9} \leftrightarrow \text{CXCL10}$  as well as negative strong axes connecting IL-10 with CXCL9 and TNF- $\alpha$ . By contrast, in the IND group was remarkable the presence of an overall multifaceted network with stronger connections between IL-10 and IL-17, and IL-10 and IFN- $\gamma$  axes along when compared to the other groups. Additional analyses showed that higher levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CXCL9, and CXCL-10 together with lower levels of IL-10 and IL-17 are associated with worse left ventricular function in ChD. The machine learning algorithms assays pointed out IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, and IL-17 as putative immunological biomarkers in ChD. No pattern could be observed when evaluating the IL-10 and IFN- $\gamma$  expression in the IND group. On the other hand, these cytokines proved to be uniform in the CARD group.

### **Conclusion**

All together, this study revealed a pattern of cytokine and chemokine expression and also their association with morbidity in ChD.

### **Keywords:**

Cytokines; chemokines; immune system; flow cytometry; Chagas disease; morbidity.

## Introduction

Chagas disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) remains an important neglected tropical disease and a significant cause of morbidity and mortality (1). It is endemic in Latin America, but has become a worldwide problem because of migration of infected individuals to developed countries, mainly in Europe and North America (2). Regionally, the disease is the major cause of physical disability secondary to tropical diseases in young adults (3, 4).

The immunopathogenesis of ChD is complex and not completely understood (5). The exact mechanisms that underlie the establishment and maintenance of the cardiac pathology are not clear (6). Despite intense research to understand the dynamics of this process, it is still necessary to better define the immunological parameters that characterize differences in morbidity and prognosis among patients with different forms of the disease.

Cytokines and chemokines are modulators of inflammatory processes that play an important role in the polarization of the immune response, cell maintenance and differentiation (7, 8); however, their patterns of expression in short, medium, and long-terms throughout the chronic phase of ChD have never been elucidated.

Although some markers have shown relatively promising correlations with disease status, most studies were performed on relatively small sets of samples. Another problem is that many markers have a high degree of overlap between groups (9). Given these findings, a composite set of biomarkers and an approach that integrates clinical and biomarker data may be more appropriate for clinical monitoring application. Furthermore, the knowledge about a pattern of cytokines and chemokines expression is important, since it makes possible the characterization of the immune response through one or a few measurements in the peripheral blood.

This study was based on analyzing repository samples collected from patients infected with *T. cruzi*. It is one of the largest analyses involving set samples from a cohort of IND and CARD patients to date. The primary aim of this study was to identify a composite set of biomarkers associated with morbidity of

ChD. Another purpose of the study was to investigate the pattern of cytokine and chemokine expression throughout the chronic phase of ChD.

## Methods

### Study population

This study comprises 234 patients with ChD from endemic areas within the state of Minas Gerais, Brazil, who were referred to the Referral Outpatient Center for Chagas Disease at the Clinical Hospital of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, from May 1994 to September 2014. The diagnosis of ChD required at least two positive serologic tests for antibodies against *T. cruzi* (indirect hemagglutination, indirect immunofluorescence, or enzyme-linked immunosorbent assay). The study was approved by the Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (protocol COEP-ETHIC 502/11) and Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou (protocol CEPESH-CPqRR 15/2011). All enrolled individuals gave written informed consent prior to the inclusion in the study.

Inclusion criteria were the diagnosis of IND defined as asymptomatic individuals, in sinus rhythm, with no significant alterations in electrocardiography, chest radiograph, and echocardiogram, and diagnosis of CARD characterized by the echocardiographic finding of a dilated left ventricle with impaired ventricular systolic function. Left ventricular diastolic diameter (LVDD), left ventricular ejection fraction (LVEF), and ratio of the early diastolic transmitral flow velocity to early diastolic mitral annular velocity (E/e' ratio) were used as parameters of the left ventricular function, where LVEF <55% and LVDD/body surface area  $\geq 31$ mm were used to define CARD patients [2]. Individuals with any other chronic inflammatory disease, thyroid dysfunction, valvular heart disease, coronary artery disease, systemic arterial hypertension, chronic obstructive pulmonary disease, hydroelectrolytic disorders, renal insufficiency, diabetes mellitus, alcoholism, and other infectious diseases were excluded from this study.

Healthy individuals from a non-endemic area for the disease, matched to ChD patients by age and gender, and showing negative serological tests for the

infection were included as a control group, NI. None of the patients were undergoing etiological treatment nor had been previously treated for *T. cruzi* infection.

In order to investigate the pattern of cytokine and chemokine expression throughout the chronic phase of ChD, a cohort sub study was performed involving 113 patients with ChD and 15 healthy individuals, included as a control group, who have had peripheral blood samples collected in three distinct years, between 1994 and 2014.

### **Flow cytometry multiplex cytokine assay**

Three different CBA kits, a Human Inflammatory Cytokine Kit, a Human Th1/Th2/Th17 Kit, and a Human chemokine Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were used to measure cytokine and chemokine levels in plasma, following manufacturer instructions as described in prior study (10).

The data were acquired in a BD FACSCalibur flow cytometry system (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyses performed using BD FCAP Array software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The standard curve was determined using a five-parameter logistic (5-PL) equation. The results were based on standard concentration curve and expressed as picogram per milliliter (pg/mL).

### **Biomarkers networks assembling**

Exploratory networks model were applied to assess the relationship among cytokines, chemokines, and echocardiographic parameters in each evaluated group. The circle structure of the networks using specific gray-scale globular nodes was chosen to highlight the total number of possible edges between all pairs of nodes observed for each evaluated group. Each variable is represented by specific globular nodes. All the statistically significant correlations ( $p < 0.05$ ) were included in the network and categorized according to the strength of the correlation as follows: weak ( $r < 0.30$ ), moderate ( $r = 0.30$  to  $0.60$ ) and strong ( $r > 0.60$ ) as proposed by Taylor (1990). Significant correlations representing the interaction between the investigated cytokines, chemokines, and echocardiographic parameters were compiled using the open source software Cytoscape (version 3.2.1).

### **Supervised and unsupervised learning algorithms**

Supervised algorithms Support Vector Machine (SVM) and k-Nearest Neighbor (k-NN) and unsupervised Hierarchical Clustering were performed through the GenePattern platform (11). k-NN leave-one-out cross validation mode was executed with  $k = 3$ , T-Test statistic for feature selection and Euclidean distance measure. Hierarchical Clustering was performed with Euclidean distance measure and pair wise complete-linkage clustering.

Machine learning algorithms are designed in order to build a system which can learn from previous experiments. Both supervised and unsupervised machine learning algorithms were applied based on the expression levels of twelve distinct immune biomarkers per individual. The aim of the supervised analysis was to build a classifier for unknown individuals by comparing their expression levels against those from individuals with known health condition (NI, IND, and CARD). It also performed unsupervised analysis in order to group individuals with close expression levels of the plasma cytokines and chemokines.

### **Statistical analyses**

Statistical comparative analyses were performed in groups of two between the NI, IND, and CARD groups, using the non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test, together with the Bonferroni correction (significance level,  $0.05/3 = 0.0167$ ). Categorical data were presented as numbers and percentages, and continuous data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or median and interquartile range (25%-75%), as appropriate.

SPSS statistical software, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) was used for all analyses. The graphs were prepared using GraphPad Prism software, version 5.0 (San Diego, CA, USA). All tests were performed considering a significance level of 5% ( $\alpha = .05$ ).

## Results

### Clinical features

The mean age of ChD patients was  $46.83 \pm 9.97$  years, and 51.4% were male. The IND group included 93 asymptomatic patients, with ages ranging from 27 to 69 years (mean of  $43.49 \pm 8.8$ ). The CARD group included 141 patients, with ages ranging from 23 to 67 years (mean of  $49.03 \pm 10.12$ ). Most CARD patients (85.8%) were in NYHA functional class I and II. Moreover, 32 healthy individuals, 16 males (50%), ranging from 27 to 58 years of age (mean of  $39.38 \pm 10.08$ ), were also included as the NI group. The demographic and clinical characteristics of ChD patients are summarized in Table 1.

**Table 1. Demographic and clinical characteristics of the Chagas disease patients.**

Variables	IND (n = 93)	CARD (n = 141)	p Value
Clinical			
Age, yrs	$43.49 \pm 8.8$	$49.03 \pm 10.12$	0.000*
Male, n/%	40 (43)	85 (60.3)	0.012*
BSA, m <sup>2</sup>	1.73 (1.65, 1.84)	1.68 (1.55, 1.77)	0.054
HR, bpm	68 (62, 75)	64 (59.75, 72)	0.039*
SBP, mmHg	120 (110, 130)	110 (100, 120)	0.002*
DBP, mmHg	82 (80, 90)	70 (60, 80)	0.001*
Ecocardiographic			
LVDD, mm	48 (45, 50)	63 (58.5, 68)	0.000*
LVEF, %	66 (63, 69)	39 (29, 47)	0.000*
E/e' ratio	9 (7, 10)	10 (6, 15.5)	0.009*

Values are expressed as mean and standard deviation (mean  $\pm$  SD), median (interquartile range) or absolute number (percentage). BSA, body surface area; HR, heart rate; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure LVDD, left ventricular diastolic diameter; LVEF, left ventricular ejection fraction; E/e' ratio, ratio of the early diastolic transmitral flow velocity to early diastolic mitral annular velocity. \*p-value < 0.05 for comparison between IND and CARD groups.

### Plasma concentrations of cytokines and chemokines

The levels of the cytokines (IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12) and the chemokines (CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL8) were evaluated in the plasma of healthy individuals and patients with indeterminate and severe forms of ChD and the results are presented in Fig 1 and Fig 2, respectively. Differences among the three groups were observed for the evaluated cytokines ( $p < 0.0001$ ) and chemokines ( $p < 0.001$ ), with exception of IL-1 $\beta$ , IL-12, CCL5, and CXCL8. When the median plasma concentrations of IL-10 and IL-17 were compared among the three groups, it was observed that patients from the IND group presented higher levels of this cytokines compared to the other groups ( $p < 0.0001$ ) Fig 1. Median IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL10, CCL2, and CXCL9 plasma levels were significantly higher in patients from the CARD group when compared to the patients from the IND and NI groups. Summary of cytokine and chemokine results for biomarkers are shown in the Table 2.

**Table 2. Summary of cytokine and chemokine results for biomarkers. The median and interquartile ranges are reported for all biomarkers evaluated.**

	NI	IND	CARD
IL-10	5.11 (4.31, 6.18)	23.9 (17.7, 31.3)	9.78 (7.7, 11.4)
IL-17	10.8 (8.96, 13.1)	26.5 (20.9, 31.5)	14.5 (9.03, 26)
IFN- $\gamma$	2,92 (1.72, 5,4)	6.5 (3.68, 10)	17.14 (12.08, 22.87)
TNF- $\alpha$	7.04 (5.13, 8.08)	12.2 (8.13, 16.2)	33.05 (27, 46.5)
IL-6	23.3 (20.9, 29.6)	47.9 (34.5, 65.1)	79.9 (33.9, 128)
IL-1 $\beta$	8.88 (8, 11.5)	24.5 (16, 29.1)	25.7 (21.3, 31.8)
IL-12	5.82 (5.22, 7.38)	5.93 (5.27, 8.35)	6.91 (5.53, 12.6)
CXCL10	21.05 (18.3, 24.9)	35.3 (29.5, 42)	63.9 (47.3, 93,7)
CCL2	17.8 (15.8, 22.9)	25 (23.6, 26.8)	54.8 (43.4, 77.7)
CXCL9	17.3 (14.5, 19.9)	26.6 (21.4, 29.1)	58.4 (41.8, 80.4)
CCL5	508 (412, 700)	2890 (2138, 3820)	2571 (1740, 3491)
CXCL8	18 (13.5, 19.6)	38.8 (28.9, 40.1)	38.8 (37.2, 40.2)

### **Cytokine and chemokine networks and their association with left ventricular function in Chagas disease**

Exploratory analysis of biomarker networks revealed that the NI group displayed a modest cytokine and chemokine response characterized by discretely distributed attributes as well as weak and moderate connecting axes involving proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines (Fig 3). By contrast, patients with ChD displayed a broad and complex network. In the IND group was remarkable the presence of an overall multifaceted network with more and stronger connectivity between IL-10 and IL-17 ( $r = 0.635$ ,  $p < 0.0001$ ), and IL-10 and IFN- $\gamma$  ( $r = -0.676$ ,  $p < 0.0001$ ) when compared to the other groups (Fig 3). Interestingly, the patterns of connections between host biomarkers observed in the CARD group were dramatically diverse than that observed in the other groups (Fig 3). This group displayed a substantial increase in number of significant interactions in the cytokines and chemokines network. Notably, it could be observed amongst IFN- $\gamma$   $\leftrightarrow$  CXCL10 ( $r = 0.601$ ,  $p < 0.0001$ ) and CXCL9  $\leftrightarrow$  CXCL10 ( $r = 0.646$ ,  $p < 0.0001$ ) axes along with strengthening of IL-10 with CXCL9 ( $r = 0.601$ ,  $p < 0.0001$ ) and TNF- $\alpha$  ( $r = -0.624$ ,  $p < 0.0001$ ), as well as IL-17 and CXCL9 ( $r = 0.604$ ,  $p < 0.0001$ ) connections when compared to NI and IND groups (Fig 3).

In order to confirm whether the plasma levels of cytokines and chemokines in fact correlates with better or worse left ventricular function in ChD, a network model was also applied to assess the relationship between these biomarkers and echocardiographic parameters of systolic and diastolic ventricular function in either IND or CARD groups (Fig 3). The correlation coefficients among cytokines and chemokines with echocardiographic parameters of left ventricular function are presented in the Table 3. Data analysis demonstrates that the IND group showed weaker interactions involving cytokines and chemokines, and parameters of cardiac function as compared to the CARD group (Fig 3). In general, a significant association were verified between lower levels of IL-17 and IL-10, and morbidity expressed by lower LVEF and higher LVDD as well as E/e' ratio in both groups (Fig 3). Interestingly, a significant positive correlation between higher levels of IL10 and IL-17, and higher LVEF were observed in the IND and in the CARD groups. In contrast, a significant negative correlation could be found between higher levels of IL-10 and IL-17, and lower LVDD in the IND group (Fig 3). Similar results could be found when comparing lower levels of IL-10 and IL-17, and higher E/e' ratio in the



same group. Plasma levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CXCL-9, and CXCL10 were inversely correlated with LVEF in the IND group. Similarly, significant negative correlations were identified when the levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CXCL-9, CXCL10, and CCL2 were compared with LVEF in the CARD group. Conversely, direct association were observed between higher levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CXLC9, CXCL10, and CCL2, and higher LVDD as well as higher E/e' ratio in the CARD group. Similar results could be found when comparing higher levels of these proinflammatory cytokines and chemokines and, higher LVDD and E/e' ratio in the IND group (Fig 3).

**Table 3.** Correlation analyses among cytokines and chemokines with echocardiographic parameters of left ventricular function in patients with indeterminate and Chagas cardiomyopathy.

Variables	IND			CARD		
	LVEF (%)	LVDD (mm)	E/e' ratio	LVEF (%)	LVDD (mm)	E/e' ratio
IL-10	<b>0.678</b>	<b>-0.428</b>	<b>-0.451</b>	<b>0.595</b>	<b>-0.428</b>	<b>-0.451</b>
IL-17	<b>0.698</b>	<b>-0.404</b>	<b>-0.306</b>	<b>0.520</b>	<b>-0.404</b>	<b>-0.306</b>
IFN- $\gamma$	<b>-0.527</b>	<b>0.328</b>	<b>0.302</b>	<b>-0.672</b>	<b>0.491</b>	<b>0.472</b>
TNF- $\alpha$	<b>-0.579</b>	<b>0.413</b>	<b>0.331</b>	<b>-0.668</b>	<b>0.423</b>	<b>0.378</b>
CXCL10	<b>-0.526</b>	<b>0.384</b>	0.131	<b>-0.664</b>	<b>0.427</b>	<b>0.543</b>
CCL2	-0.164	<b>0.268</b>	0.003	<b>-0.605</b>	<b>0.476</b>	<b>0.516</b>
CXCL9	<b>-0.266</b>	0.044	0.135	<b>-0.659</b>	<b>0.414</b>	<b>0.547</b>
CCL5	-0.041	0.071	0.057	-0.059	-0.043	0.025
CXCL8	0.203	-0.125	-0.067	-0.061	0.123	0.103

*The Spearman's rank correlation coefficients highlighted in bold are statistically significant at the 0.01 level*

*(2-tailed). IND = indeterminate form; CARD = Chagas cardiomyopathy.*

### **Analysis of overall cytokine and chemokine signatures**

It was performed clustering techniques to group individuals and biomarkers with similar expression signatures (Fig 4). Two hierarchical clustering assays were performed. The first assay was built with all twelve biomarkers values of each individual. Clearly, the hierarchical clustering algorithm clustered IL-10 and IL-17 together with the shortest distance. Additionally, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were also clustered together with the second closest distance. Therefore, it was performed a second hierarchical clustering with only the expression of markers IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, and IL-17. When only these four markers were considered, an interesting pattern of expression was easily observed. While most CARD patients presented higher levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , most IND patients displayed higher levels of IL-

10 and IL-17. The NI individuals remained with lower levels of all four markers when compared to the other groups. These results prompted us the question of whether the four markers could be used to build a classifier.

In order to build the classifier, it was selected the k-NN algorithm. Despite being among the simplest machine learning algorithms, the k-NN performance was excellent. In a cross-validation mode, only two individuals were misclassified among a panel of 266 individuals. Confusion matrix showed that both misclassified individuals presented the IND form of the disease. All CARD patients, as well as NI individuals, were correctly classified by k-NN algorithm. The accuracy, sensitivity and specificity values of the prediction assays were above 99%.

### **Pattern of cytokine and chemokine expression throughout the chronic infection with *T. cruzi***

The evaluation of cytokine and chemokine expression throughout the chronic phase of ChD showed that the plasma levels of IL-17, TNF- $\alpha$ , CCL2, and CXCL-8 remained uniform in all evaluated groups ( $p > 0.05$ ) (Fig 5 and Fig 6). Data analysis demonstrated that non-infected controls displayed a balanced pattern of cytokine and chemokine expression, represented by evenly controlled immune response. In the IND patients it was also verified a regular pattern of expression of the cytokines IL-6 ( $p = 0.137$ ), IL-12 ( $p = 0.816$ ), and IL-1 $\beta$  ( $p = 0.724$ ) (Fig 5). Strikingly, the data analysis showed no pattern in the profile of IL-10 ( $p = 0.003$ ) and IFN- $\gamma$  expression ( $p = 0.022$ ) in the same group of patients (Fig 5). Conversely, the pattern of expression of these cytokines proved to be regular in the CARD group ( $p = 0.259$  and  $p = 0.583$ , respectively) (Fig 5). These patients presented a regular pattern in the production of the chemokines CXCL-10 ( $p = 0.758$ ) and CCL5 ( $p = 0.391$ ) as well (Fig 6).

## Discussion

The broad samples from ChD patients who not had been previously treated for *T. cruzi* infection, then, without any interference in the natural history of the disease, probably allowed the obtainment of consistent and robust data. Moreover, the methodology used in the data analysis might have also favored to clear up the knowledge about the immune response in those patients.

Immunological measurements are usually derived from multiple interrelated systems (12). The machine learning algorithms assays used to bioinformatics analyses in this study might be more accurate than classical methods in multivariate analysis of immunological data. The results pointed out IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, and IL-17 as putative immunological biomarkers in ChD. Here we also showed consistent evidences that there is pattern of cytokine and chemokine expression throughout the chronic phase of ChD.

The present study included quantitative echocardiographic parameters to assess the left ventricular function. In general, systolic dysfunction and impairment of left ventricular filling are an important hallmark as well as predictors of functional capacity and mortality in patients with ChD (2). The E/e' ratio (a marker of LV filling pressure) has an effect on mortality in Chagas cardiomyopathy (13).

The high levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  observed in the CARD group support the idea that Th1 immune responses are involved in heart lesions of ChD patients (14). These results reinforce findings from previous studies (14-20). The exacerbated Th1 response observed in the peripheral blood of CARD patients seems to reflect on the Th1-rich inflammatory infiltrate predominantly secreting IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , with lower production of IL-4, IL-6, IL-7, and IL-15 found in their myocardium as evidenced by immunohistochemistry and mRNA expression studies (21, 22). The stability of IFN- $\gamma$ , observed in these patients, might also explain the inflammation due to the maintenance of regular high levels of that cytokine. However, TNF- $\alpha$  was uniform in both IND and CARD patients. This finding demonstrates that higher levels of this cytokine are maintained in patients with the cardiac form and collaborate with the intense inflammation. On the other hand, this cytokine remains regularly at low levels in IND patients and it is not able to induce an exacerbated inflammatory response as observed in patients with the

severe form of the disease probably due to the efficient control of anti-inflammatory cytokines (6).

Higher levels of IL-10 and IL-17 observed in the IND group throughout the chronic phase of ChD revealed the important role of those cytokines in the maintenance of the immunoregulatory balance and avoid the development of cardiac dysfunction. The results showed stability of IL-10 in CARD patients, but not in the IND patients, which indicates that this cytokine remains regularly at low levels during the chronic Chagas cardiomyopathy and those levels are insufficient to control the inflammation and tissue damage. In IND patients the instability of IL-10 might be important to predict the progression of some indeterminate patients towards the cardiac forms of the disease.

Although, the data did not show any difference in the levels of IL-1 $\beta$  and higher levels of IL-6 in patients with the cardiac form, those cytokines seem to display a regular profile of expression in IND patients. The cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 are important for the differentiation of Th17 cells, which might explain the higher levels of IL-17 expressed in the plasma of IND patients. On the opposite side, the instability of IL-1 $\beta$  and IL-6 in CARD group might explain the low level of IL-17 in the plasma of those patients. Therefore, the stability of IL-17 in both IND and CARD groups reflects the effect of an ongoing infection in these patients and the secretion of this may continue even if it occurs at much lower levels.

Data analysis showed that CXCL9 and CXCL10 are highly expressed in CARD group. However, only CXCL10 showed to be uniform in this group, which suggest that this chemokine might be the most induced by high levels of IFN- $\gamma$  observed in patients presenting the severe form of the disease. Moreover, the stability profile and high levels of CXCL10 verified in the CARD group indicate that it might be an important chemokine to the induction of inflammation due to its role to attract several cell types, such as T cells. The low levels of CXCL9 and CXCL10 and their instability in the IND group might be cause by low levels of IFN- $\gamma$ , and also indicate less cell recruitment and explain lower inflammation compared to the CARD group.

Similarly, the CARD group presented higher levels of CCL2 compared to the other groups and higher levels of CCL5 compared to NI group. In addition, the CARD group displayed a stability profile of CCL2 and CCL5, whereas in the IND group higher levels of CCL5 could be verified when compared to NI group. CCL2

recruits memory T cells, dendritic cells and monocytes to the inflammation site contributing to the attraction induced by CXCL9 and CXCL10 in patients with the cardiac form of the disease. In spite of high levels of CCL5 observed in the IND group and the involvement of this chemokine in the attraction of different cell populations, CCL5 does not seem to present a profile of expression in the indeterminate form of the disease.

The IND group showed a network of low and moderate correlations between the proinflammatory cytokines and chemokines, whereas a strong correlation between the cytokines IL-10 and IL-17. Those cytokines also correlated positively with LVEF and negatively with E/e' ratio. On the other hand, the biomarkers network in the CARD group showed intense correlation between the proinflammatory cytokines and chemokines as well as negative correlation between regulatory cytokines and interferon induced chemokines.

The complex network observed in the CARD group demonstrate a narrow connection between the high expression of proinflammatory cytokines and chemokines together with low expression of IL-10 and IL-17 with worse left ventricular function. By contrast, the regulatory cytokines seem to be important to control the inflammation and avoid the progression to the severe forms of Chagas heart disease. All together, this study revealed a pattern of cytokine and chemokine expression and also their association with cardiac function in ChD. The knowledge about the pattern of cytokines and chemokines expression might makes possible the characterization of the immune response through one or a few measurements in the peripheral blood from patients.

## **Acknowledgments**

We thank all the personal from the Division of Echocardiography, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, and the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology as well as the Flow Cytometry Platform, René Rachou Research Center, FIOCRUZ, for their technical assistance. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health – PDTIS – FIOCRUZ for the use of its facilities. We are thankful to the CNPq and FAPEMIG

funding agencies in Brazil for their financial support: JASG, MCPN, RCO and MOCR are CNPq fellows; GRS is a CAPES fellow.

**Funding.** This work was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ-02601-10, APQ-04129-10 and PPM-00501-13) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 475497/2007-4, 403592/2008-9 and 478846/2009-6).

**Conflict of interest.** The authors do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest. All authors: No reported conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

1. Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2012 Oct;**9**(10):576-589.
2. Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol*. [Review]. 2013 Aug 27;**62**(9):767-776.
3. Cubillos-Garzon LA, Casas JP, Morillo CA, Bautista LE. Congestive heart failure in Latin America: the next epidemic. *Am Heart J*. 2004 Mar;**147**(3):412-417.
4. Sousa GR, Costa HS, Souza AC, Nunes MC, Lima MM, Rocha MO. Health-related quality of life in patients with Chagas disease: a review of the evidence. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015 Mar-Apr;**48**(2):121-128.
5. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators of inflammation*. 2014;**2014**:683230.
6. Dutra WO, Menezes CA, Magalhaes LM, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite immunology*. 2014 Aug;**36**(8):377-387.
7. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*. 2014;**32**:659-702.
8. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nature reviews Immunology*. 2015 Feb;**15**(2):87-103.
9. Keating SM, Deng X, Fernandes F, Cunha-Neto E, Ribeiro AL, Adesina B, Beyer AI, Contestable P, Custer B, Busch MP, Sabino EC, NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-III IC. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. *International journal of cardiology*. 2015 Nov 15;**199**:451-459.
10. Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeghai K, Bishop JE, Varro R. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clinical chemistry*. 1999 Sep;**45**(9):1693-1694.



11. Reich M, Liefeld T, Gould J, Lerner J, Tamayo P, Mesirov JP. GenePattern 2.0. *Nat Genet.* 2006 May;**38**(5):500-501.
12. Farber DL, Netea MG, Radbruch A, Rajewsky K, Zinkernagel RM. Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. *Nature reviews Immunology.* 2016 Feb 2;**16**(2):124-128.
13. Nunes MP, Colosimo EA, Reis RC, Barbosa MM, da Silva JL, Barbosa F, Botoni FA, Ribeiro AL, Rocha MO. Different prognostic impact of the tissue Doppler-derived E/e' ratio on mortality in Chagas cardiomyopathy patients with heart failure. *J Heart Lung Transplant.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jun;**31**(6):634-641.
14. Rocha Rodrigues DB, dos Reis MA, Romano A, Pereira SA, Teixeira Vde P, Tostes S, Jr., Rodrigues V, Jr. In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clinical & developmental immunology.* 2012;**2012**:361730.
15. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infection and immunity.* 2003 Mar;**71**(3):1185-1193.
16. Sousa GR, Gomes JA, Fares RC, Damasio MP, Chaves AT, Ferreira KS, Nunes MC, Medeiros NI, Valente VA, Correa-Oliveira R, Rocha MO. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PloS one.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2014;**9**(3):e87082.
17. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2004 Apr 1;**38**(7):943-950.
18. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, Bocchi EA, Teixeira HC, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of autoimmunity.* 2001 Aug;**17**(1):99-107.
19. de Araujo FF, Correa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RC, Ferreira KS, Nunes MC, Keesen TS, Damasio MP, Teixeira-Carvalho A, Gomes JA. Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and

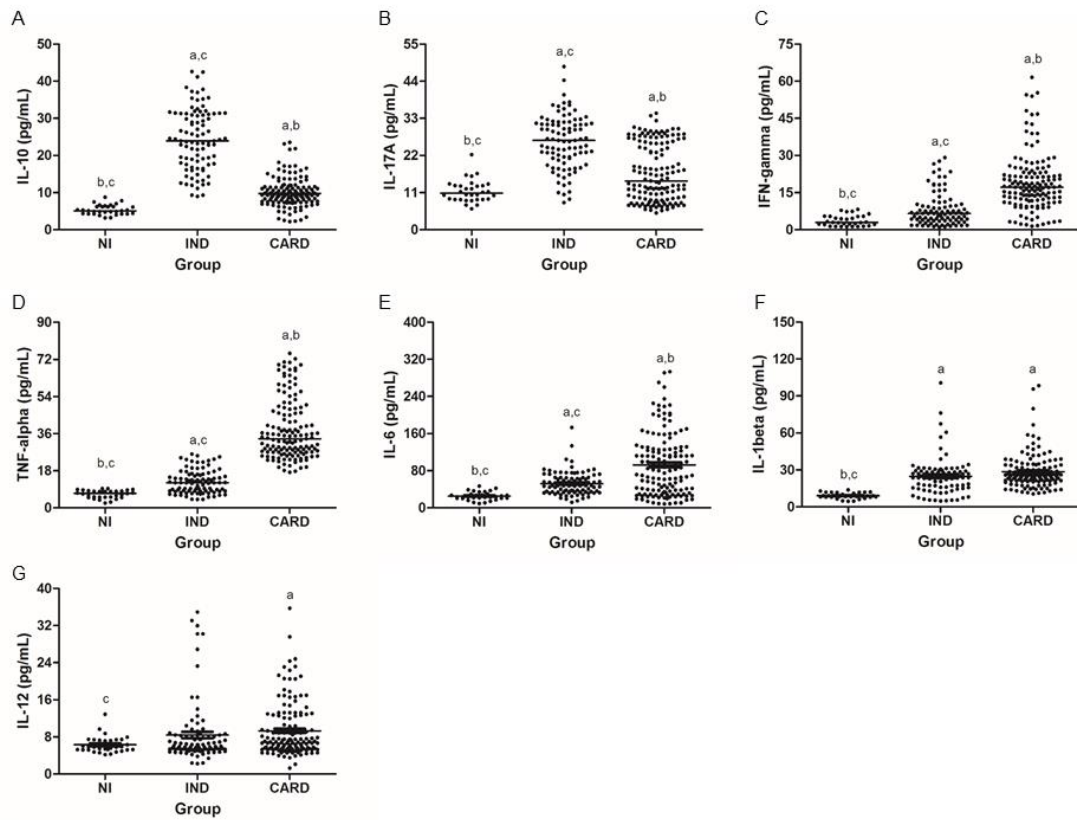
reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Aug;**217**(8):768-777.

20. Lula JF, Rocha MO, Nunes Mdo C, Ribeiro AL, Teixeira MM, Bahia MT, Talvani A. Plasma concentrations of tumour necrosis factor-alpha, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and FasLigand/CD95L in patients with Chagas cardiomyopathy correlate with left ventricular dysfunction. *European journal of heart failure*. 2009 Sep;**11**(9):825-831.

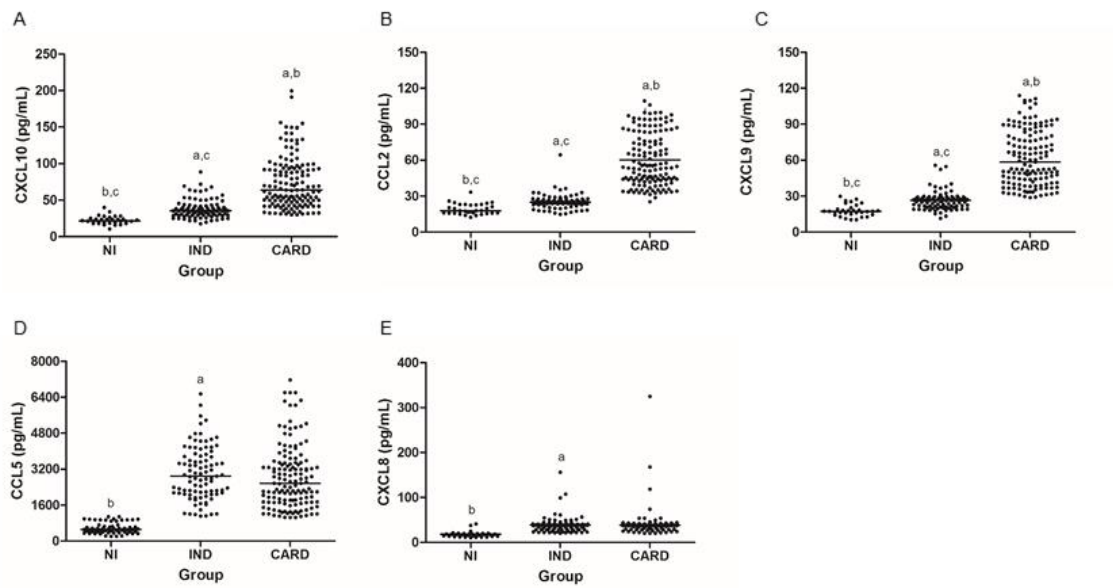
21. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatou D, Benvenuti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalil J, Liew CC. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *The American journal of pathology*. 2005 Aug;**167**(2):305-313.

22. Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairena EC, Bacal F, Bocchi E, Guilherme L, Zheng XX, Liew FY, Higuchi ML, Kalil J, Cunha-Neto E. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Scandinavian journal of immunology*. 2007 Aug-Sep;**66**(2-3):362-371.

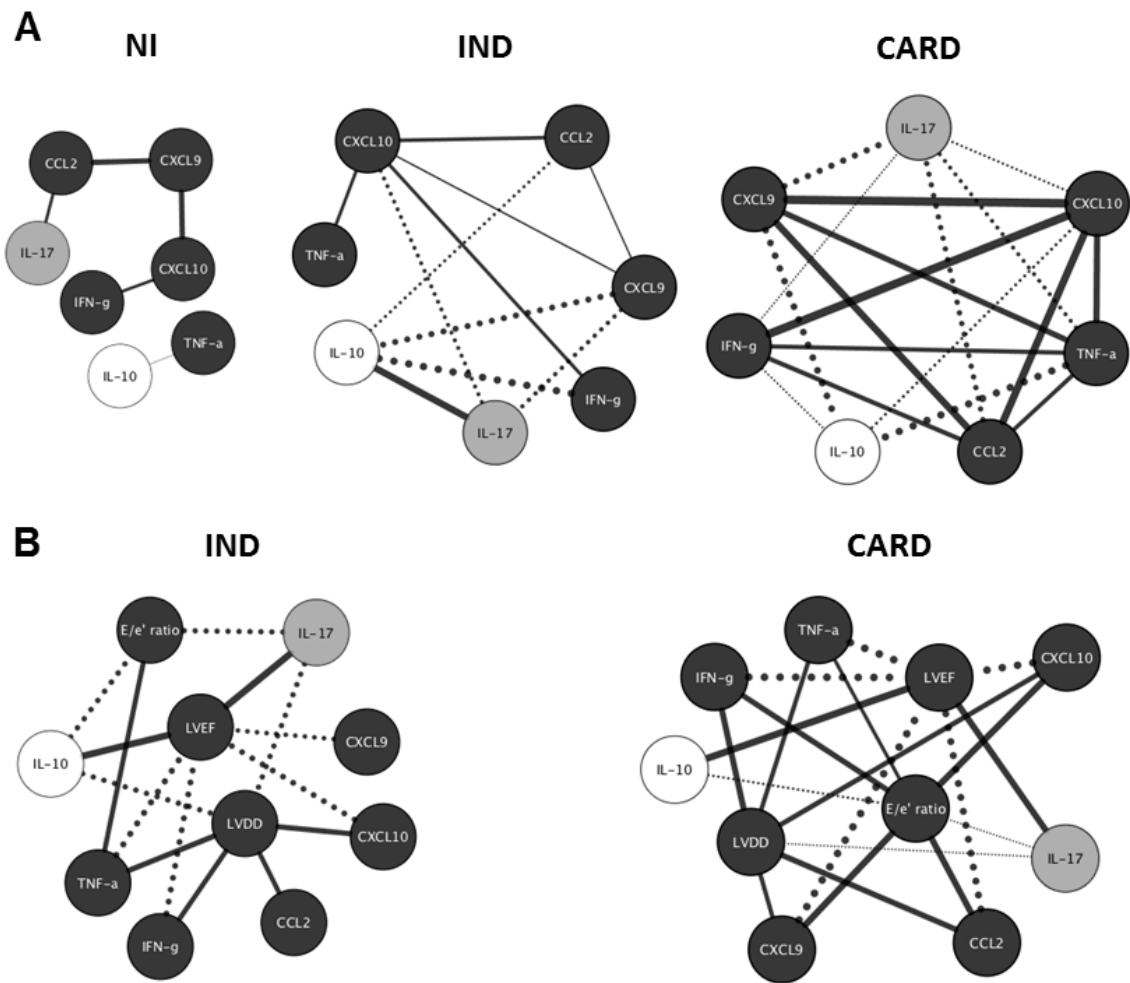
## Figure Legends



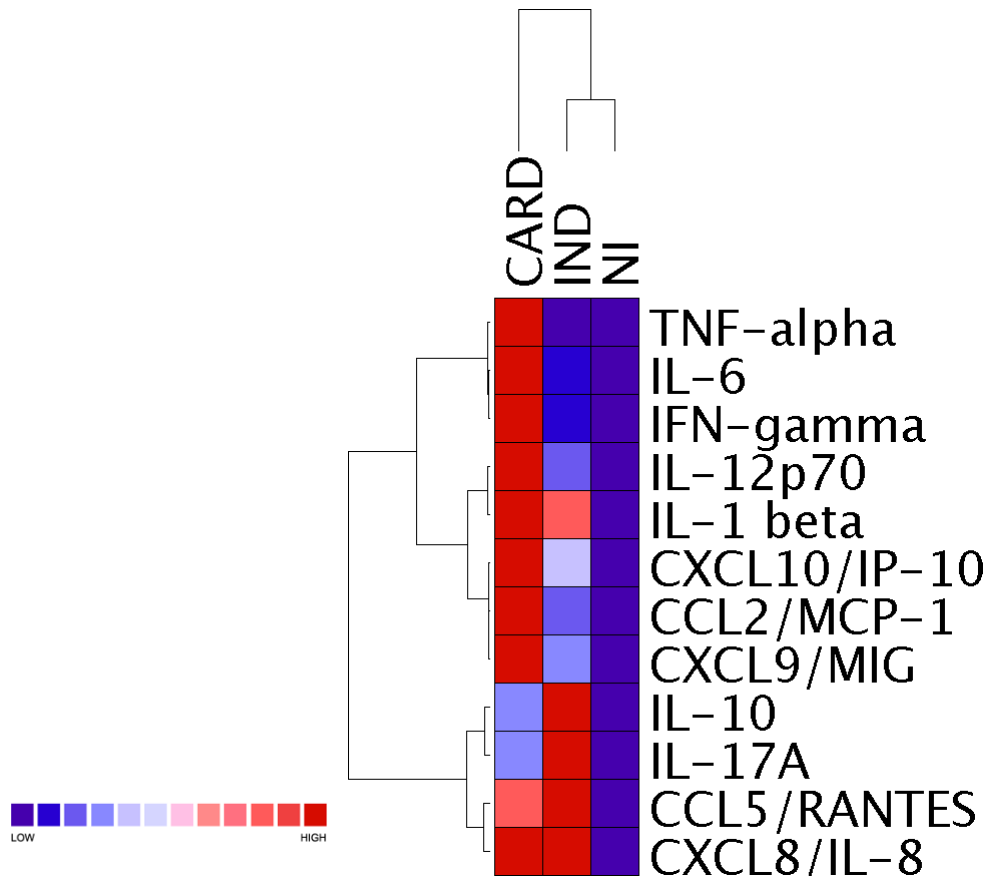
**Fig 1. Plasma concentrations of cytokines in the studied groups.** The groups evaluated were: health controls (NI, n = 32, white box), indeterminate form (IND, n = 93, light gray box), and Chagas cardiomyopathy (CARD, n = 141, dark gray box). The results were expressed by pg/mL. Significant differences at p-value < 0.05 are highlighted by letters for difference of a group as compared to NI indicated by “a”, to IND indicated by “b”, and to CARD indicated by “c”.



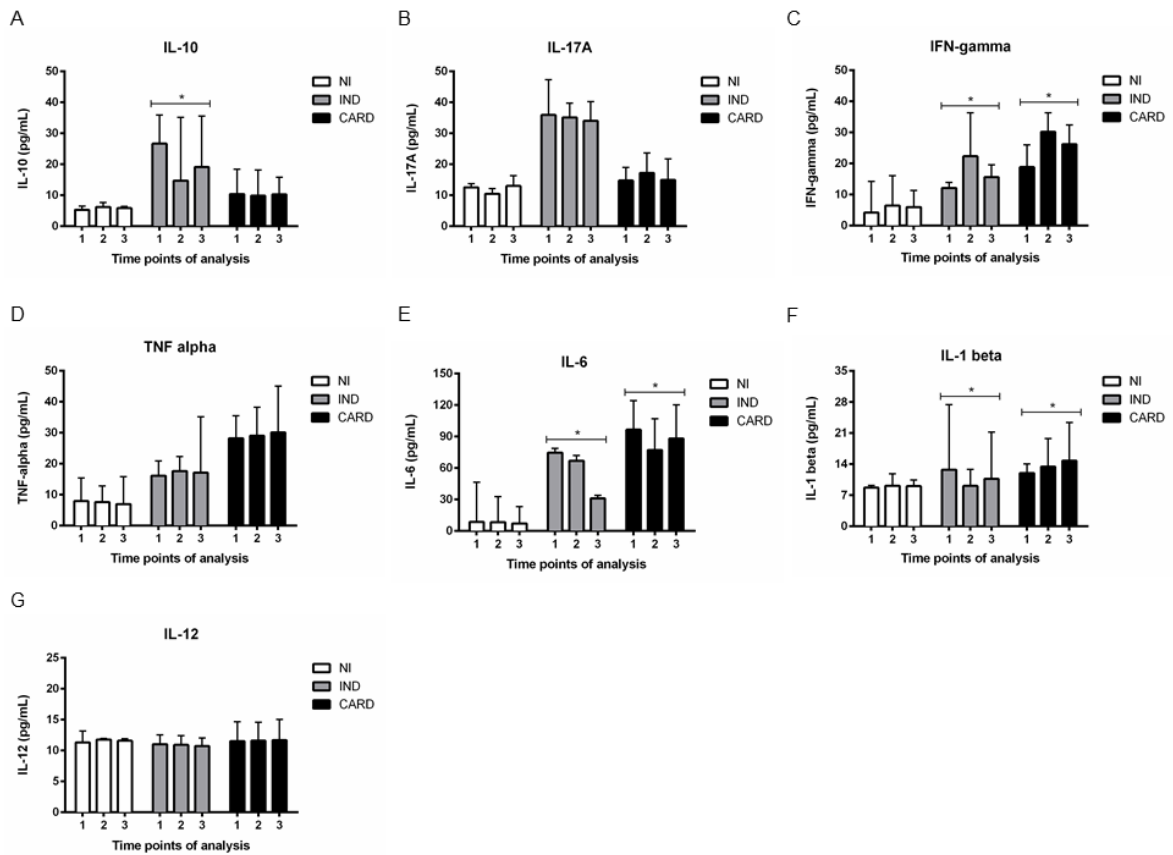
**Fig 2. Plasma concentrations of chemokines in the studied groups.** The groups evaluated were: health controls (NI, n = 32, white box), indeterminate form (IND, n = 93, light gray box), and Chagas cardiomyopathy (CARD, n = 141, dark gray box). The results were expressed by pg/mL. Significant differences at p-value < 0.05 are highlighted by letters for difference of a group as compared to NI indicated by “a”, to IND indicated by “b”, and to CARD indicated by “c”.



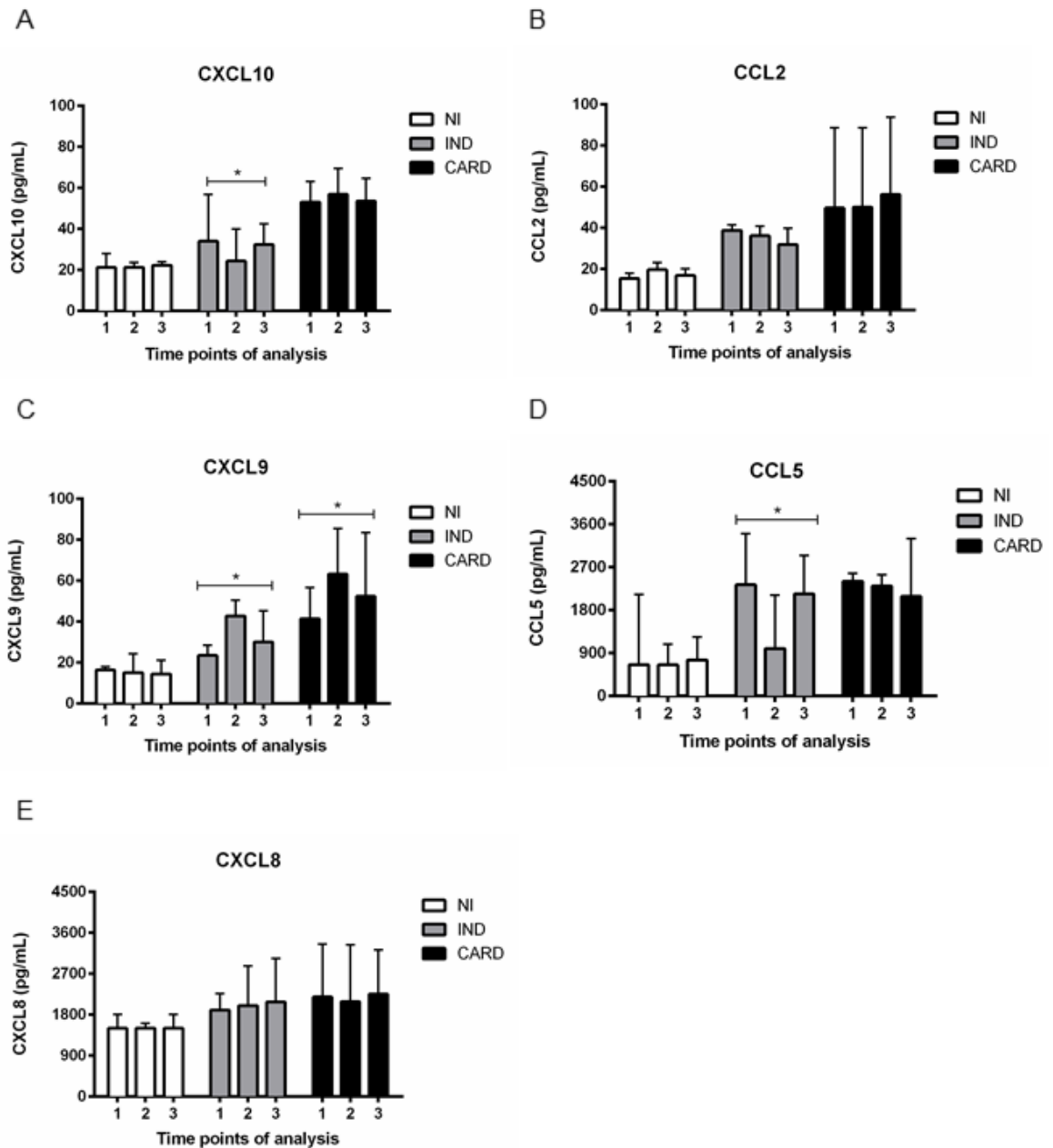
**Fig 3. Cytokines and chemokines networks and their association with left ventricular function in Chagas disease.** The groups evaluated were: health controls (NI,  $n = 32$ ), indeterminate form (IND,  $n = 93$ ), and Chagas cardiomyopathy (CARD,  $n = 141$ ). A) Interactions between cytokines and chemokines in the NI, IND, and CARD groups. B) Biomarkers networks were assembled to assess the association between human cytokines and chemokines, and echocardiographic variables of cardiac function in each evaluated group. Circular layouts underscore markers by specific gray-scale globular nodes. The continuous lines represent positive correlation and the traced lines represent the negative correlation. Connecting edges display underscore weak ( $r < 0.30$ ), moderate ( $r = 0.30$  to  $0.60$ ), and strong ( $r > 0.60$ ) correlations between the variables as proposed by Taylor (1990).



**Fig 4. Systems biology strategy for analyzing overall cytokine and chemokine signatures by heatmap.** Each cell represents the median of the biomarker for the corresponding group. Bioinformatics tool applied used heatmap computational method to preprocess flow cytometry data and to identify the overall cytokine and chemokine signatures. For each row, the medians are then scaled to mean 0 and standard deviation 1. The dendrogram was generated based on hierarchical clustering with transposed complete linkage and 1-Pearson correlation as distance.



**Fig 5. Pattern of cytokine expression throughout the chronic phase of Chagas disease.** The groups evaluated were: health controls (NI, n = 15, white bar), indeterminate form (IND, n = 39, light gray bar), and Chagas cardiomyopathy (CARD, n = 74, dark gray bar). The evaluation of the pattern of expression for each cytokine was performed in three different time points between 1994 and 2014. The results were expressed by pg/mL. Significant differences at p-value < 0.05 are highlighted by asterisks to indicate variability in the evaluated group.



**Fig 6. Pattern of chemokine expression throughout the chronic phase of Chagas disease.** The groups evaluated were: health controls (NI, n = 15, white bar), indeterminate form (IND, n = 39, light gray bar), and Chagas cardiomyopathy (CARD, n = 74, dark gray bar). The evaluation of the pattern of expression for each chemokine was performed in three different time points between 1994 and 2014. The results were expressed by pg/mL. Significant differences at p-value < 0.05 are highlighted by asterisks to indicate variability in the evaluated group.



## 6 CONCLUSÕES

- A alta expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias assim como a baixa expressão de IL-10 e IL-17 associam-se com maior morbidade na doença de Chagas.
- As citocinas IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e as quimiocinas CXCL9 e CXCL10, em conjunto, podem representar importantes biomarcadores de morbidade e prognóstico na cardiopatia chagásica crônica.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão clínica da doença de Chagas parece resultar de fatores múltiplos e complexos ligados ao parasito, ao hospedeiro e à modalidade de interação entre eles. Não se encontrava definido, até o momento, se o padrão de resposta imune, expressado pelos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas, constituía uma característica comum e uniforme em pacientes com grau semelhante de morbidade.

A constatação de haver uniformidade interna no padrão da resposta imune no grupo IND e no grupo CARD fornece fundamento para que se possa definir este perfil por meio da dosagem de citocinas e quimiocinas em uma ou poucas amostras de sangue periférico desses pacientes. Os achados desse estudo são importantes e revelam, por outro lado, a existência de variabilidade no padrão de expressão de citocinas e quimiocinas quando os grupos foram comparados.

Os resultados deste estudo contribuem, ainda, para a melhor compreensão do padrão da resposta imune e suas relações com a morbidade da cardiopatia chagásica. Esses elementos são importantes para o refinamento da estratificação de risco, assim como para a abordagem clínica, prevenção e tratamento precoce e adequado dos pacientes com doença de Chagas.

## **8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

Neste estudo realizou-se análise temporal de casos. Por se tratar de estudo observacional com corte transversal não é possível fazer qualquer inferência sobre causa ou efeito. O padrão uniforme na expressão de citocinas e quimiocinas plasmáticas nos em pacientes observado nos grupos de pacientes com a forma indeterminada e cardiomiopatia dilatada não deve ser tomado como conclusivo. Embora a amostra deste subestudo seja homogênea e razoavelmente grande, desconhe-se o seu poder. De forma ainda mais importante, a expressão plasmática de citocinas e quimiocinas não expressa necessariamente a imunopatogenia tecidual.

## 9 PERSPECTIVAS

Os processos de fibrogênese e remodelagem cardíaca possivelmente, associam-se diretamente com a resposta inflamatória na cardiopatia chagásica. É possível, ainda, que o maior grau de arritmogenicidade possa ser previsto pela dosagem de biomarcadores do metabolismo colágeno. Neste sentido, é importante verificar a associação entre a resposta imune, expressa por citocinas e quimiocinas com o grau de fibrose miocárdica e arritmogenicidade em pacientes com cardiopatia chagásica crônica. Além disso, é importante validar os resultados do estudo que apontam as citocinas IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e as quimiocinas CXCL9 e CXCL10, em conjunto, como potenciais biomarcadores de morbidade e prognóstico na cardiopatia chagásica crônica.

Por fim, não se sabe se a expressão da resposta imunológica apresentada pelos pacientes com cardiomiopatia chagásica é uma característica específica dessa doença ou resposta comum aos pacientes com cardiomiopatias de etiologia diversa. Neste contexto, é igualmente importante verificar a existência ou não de especificidade, e a relação da resposta imune com o grau de morbidade em pacientes com cardiomiopatia chagásica e não chagásica.

Os resultados destes estudos, em andamento, poderão contribuir para o melhor conhecimento do papel da resposta imune na patogênese da cardiopatia chagásica, especialmente no que se refere à evolução clínica, remodelagem cardíaca e arritmogenicidade, assim como para a definição refinada dos pacientes candidatos a implante de cardiodesfibrilador implantável e adoção de medidas terapêuticas visando à otimização do emprego desta importante, mas dispendiosa e complexa forma de terapia.

## REFERÊNCIAS

ABEL, L. C. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Autoimmun**, v. 17, n. 1, p. 99-107, Aug 2001.

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp Parasitol**, v. 84, n. 2, p. 231-44, Nov 1996.

ACOSTA, A. M.; SANTOS-BUCH, C. A. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. **Circulation**, v. 71, n. 6, p. 1255-61, Jun 1985.

ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1124-31, Mar 6 2007.

AHMED, M.; GAFFEN, S. L. IL-17 in obesity and adipogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 6, p. 449-53, Dec 2010.

AL-SABBAGH, A. et al. Evidence for cross-reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein in experimental Chagas disease. **Exp Parasitol**, v. 89, n. 3, p. 304-11, Jul 1998.

ARAUJO, F. F. et al. Potential role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>HIGH</sup> regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Front Biosci**, v. 12, p. 2797-806, 2007.

ARAUJO, F. G. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>) T lymphocytes. **Infect Immun**, v. 57, n. 7, p. 2246-8, Jul 1989.

AWASTHI, A.; KUCHROO, V. K. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. **Int Immunol**, v. 21, n. 5, p. 489-98, May 2009.

BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol**, v. 167, n. 3, p. 1245-53, Aug 1 2001.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J Intern Med**, v. 250, n. 2, p. 91-104, Aug 2001.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 1, p. 127-31, Jan 1998.

BAKER, B. J. *et al.* Relation of right ventricular ejection fraction to exercise capacity in chronic left ventricular failure. **Am J Cardiol**, v. 54, n. 6, p. 596-9, Sep 1984.

BARBOSA, M. M. *et al.* N-terminal proBNP levels in patients with Chagas disease: a marker of systolic and diastolic dysfunction of the left ventricle. **Eur J Echocardiogr**, v. 8, n. 3, p. 204-12, Jun 2007.

BARROS, M. L. *et al.* [Association between left ventricular wall motion abnormalities and ventricular arrhythmia in the indeterminate form of Chagas disease]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 2, p. 213-6, Mar-Apr 2011.

BARROS, M. V. *et al.* Tissue Doppler imaging enables the identification of diastolic dysfunction of pseudonormal pattern in Chagas' disease. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 14, n. 5, p. 353-9, May 2001.

BARROS, M. V. *et al.* Diastolic function in Chagas' disease: an echo and tissue Doppler imaging study. **Eur J Echocardiogr**, v. 5, n. 3, p. 182-8, Jun 2004.

BEATTIE, L. *et al.* Leishmania donovani-induced expression of signal regulatory protein alpha on Kupffer cells enhances hepatic invariant NKT-cell activation. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 1, p. 117-23, Jan 2010.

BENITEZ-HERNANDEZ, I. *et al.* Proteolytic cleavage of chemokines by Trypanosoma cruzi's cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists. **Immunobiology**, v. 215, n. 5, p. 413-26, May 2010.

BERMEJO, D. A. *et al.* Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORgammat and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. **Nat Immunol**, v. 14, n. 5, p. 514-22, May 2013.

BESTETTI, R. B.; MUCCILLO, G. Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. **Int J Cardiol**, v. 60, n. 2, p. 187-93, Jul 25 1997.

BISHOP, J. E.; DAVIS, K. A. A flow cytometric immunoassay for beta2-microglobulin in whole blood. **J Immunol Methods**, v. 210, n. 1, p. 79-87, Dec 15 1997.

BOGLIOLO, L. [Anatomic causes of cardiac insufficiency in chronic chagasic cardiopathy (myocarditis) studied in comparison to anatomic causes of cardiac insufficiency in other cardiopathies. Part I]. **Arq Bras Cardiol**, v. 29, n. 5, p. 419-24, Oct 1976.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 114, n. 2, p. 103-10, Oct 1997.

CAEIRO, T. *et al.* Abnormal left ventricular diastolic function in chronic Chagas' disease: an echocardiographic study. **Int J Cardiol**, v. 9, n. 4, p. 417-24, Dec 1985.

CARDILLO, F. *et al.* Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, p. 128-34, Jan 1996.

CHANDRASEKAR, B. *et al.* Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Am J Pathol**, v. 152, n. 4, p. 925-34, Apr 1998.

CHANG, S. H.; DONG, C. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. **Cell Signal**, v. 23, n. 7, p. 1069-75, Jul 2011.

CHEN, R. *et al.* Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. **Clin Chem**, v. 45, n. 9, p. 1693-1694, Sep 1999.

CHUNG, D. R. *et al.* CD4<sup>+</sup> T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 170, n. 4, p. 1958-63, Feb 15 2003.

COURA, J. R. *et al.* [Morbidity in Chagas' disease. IV. Longitudinal study of 10 years in Pains and Iguatama, Minas Gerais, Brazil]. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p. 73-80, Jan-Mar 1985.

CUBILLOS-GARZON, L. A. *et al.* Congestive heart failure in Latin America: the next epidemic. **Am Heart J**, v. 147, n. 3, p. 412-7, Mar 2004.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **J Clin Invest**, v. 98, n. 8, p. 1709-12, Oct 15 1996

CUNHA-NETO, E. *et al.* Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 8, p. 3541-5, Apr 11 1995.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. **Am J Pathol**, v. 167, n. 2, p. 305-13, Aug 2005.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 252-8, Jul 2009.

CUNHA-NETO E., CHEVILLARD C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. **Mediators Inflamm**, 2014:683230, Aug 2014.

DA MATTA GUEDES, P. M. *et al.* IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e604, 2010.

DAVILA, D. F. *et al.* Cardiac autonomic control mechanisms in the pathogenesis of chagas' heart disease. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2012, p. 980739, 2012.

DE ARAUJO, F. F. *et al.* Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, v. 217, n. 8, p. 768-77, Aug 2012.

DE ARAUJO, F. F. *et al.* Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. **Hum Pathol**, v. 42, n. 2, p. 299-301, Feb 2011.

DE PAOLA, A. A. *et al.* Development of congestive heart failure and alterations in left ventricular function in patients with sustained ventricular tachyarrhythmias treated with amiodarone. **Am J Cardiol**, v. 60, n. 4, p. 276-80, Aug 1987.

DEC, G. W.; FUSTER, V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 331, n. 23, p. 1564-75, Dec 1994.

DESHMANE, S. L. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 6, p. 313-26, Jun 2009.

DIAS, E.; LARANJA, F. S.; NOBREGA, G. Doença de Chagas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 43, p. 495-581, 1945.

DIAS, J. C. [Globalization, inequity and Chagas disease]. **Cad Saude Publica**, v. 23 Suppl 1, p. S13-22, 2007.



DOS SANTOS, R. R. *et al.* Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p. 29-39, Jan 1992.

DOS REIS, G. A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 2, p. 84-90, Feb 2011.

DOTIWALA, F. *et al.* Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. **Nat Med**, v. 22, n. 2, 210-6, Feb 2016.

DUTRA, W. O. *et al.* Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. **Scand J Immunol**, v. 51, n. 1, p. 91-7, Jan 2000.

DUTRA, W. O. *et al.* Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. **Scand J Immunol**, v. 45, n. 1, p. 74-80, Jan 1997.

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

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

DUTRA, W. O. *et al.* Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunol**, v. 36, n. 8, p. 377-87, Aug 2014.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 12, p. 581-7, Dec 2005.

FAE, K. C. *et al.* CXCL9/Mig mediates T cells recruitment to valvular tissue lesions of chronic rheumatic heart disease patients. **Inflammation**, v. 36, n. 4, p. 800-11, Aug 2013.

FARBER, J. M. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. **J Leukoc Biol**, v. 61, n. 3, p. 246-57, Mar 1997.

FARES, R. C. *et al.* Identification of phenotypic markers of B cells from patients with Chagas disease. **Parasite Immunol**, v. 35, n. 7-8, p. 214-23, Jul 2013.

FERREIRA, R. C. *et al.* Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 407-11, Apr 2003.

FREITAS, H. F. *et al.* Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: role of Chagas' heart disease. **Int J Cardiol**, v. 102, n. 2, p. 239-47, Jul 2005.

FRENGEN, J. *et al.* Homogeneous immunofluorometric assays of alpha-fetoprotein with macroporous, monosized particles and flow cytometry. **Clin Chem**, v. 39, n. 10, p. 2174-81, Oct 1993.

FULWYLER, M. J.; MCHUGH, T. M. Flow microsphere immunoassay for the quantitative and simultaneous detection of multiple soluble analytes. **Methods Cell Biol**, v. 33, p. 613-29, 1990.

GAFFEN, S. L. An overview of IL-17 function and signaling. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 402-7, Sep 2008.

GAFFEN, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 8, p. 556-67, Aug 2009.

GALLIMORE, A. M.; GODKIN, A. Epithelial barriers, microbiota, and colorectal cancer. **N Engl J Med**, v. 368, n. 3, p. 282-4, Jan 2013.

GARCIA-ALVAREZ, A. *et al.* Chagas cardiomyopathy: the potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 9, 2010.

GAZZINELLI, R. T. *et al.* The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 10, p. 2501-6, Oct 1992.

GOMES, J. A. *et al.* 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.

GOMES, J. A. *et al.* Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. **Hum Immunol**, v. 75, n. 1, p. 20-8, Jan 2014.

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.

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 659-702, 2014.

GU, C.; WU, L.; LI, X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. **Cytokine**, v. 64, n. 2, p. 477-85, Nov 2013.

GUEDES, P. M. *et al.* Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 4, p. e1630, 2012.

GUEDES, P. M. *et al.* IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 2, p. e604, 2010.

GUEDES, P. M. *et al.* Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 139, n. 1-2, p. 106-13, Nov 2010.

HAFLER D. A. Cytokines and interventional immunology. **Nat Rev Immunol**, v. 7, p. 423, 2007.

HARDISON, J. L. *et al.* Chemokine CC receptor 2 is important for acute control of cardiac parasitism but does not contribute to cardiac inflammation after infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis**, v. 193, n. 11, p. 1584-8, Jun 2006.

HARDISON, J. L. *et al.* The chemokines CXCL9 and CXCL10 promote a protective immune response but do not contribute to cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun**, v. 74, n. 1, p. 125-34, Jan 2006.

HARDY, R. R. *et al.* Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5+ B cells. **Immunol Rev**, v. 137, p. 91-118, Feb 1994.

HARDY, R. R.; HAYAKAWA, K. Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog, Leu-1 B. **Immunol Rev**, v. 93, p. 53-79, Oct 1986.

HIGUCHI MDE, L. *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc Res**, v. 60, n. 1, p. 96-107, Oct 2003.

HIGUCHI MDE, L. *et al.* Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 423, n. 3, p. 157-60, 1993.

HOLSCHER, C. *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon

receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect Immun**, v. 66, n. 3, p. 1208-15, Mar 1998.

HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Murine *Trypanosoma cruzi* infection: a role for TH2 cells in the immunopathology of chronic infection. **Res Immunol**, v. 142, n. 2, p. 141-3, Feb 1991.

HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *et al.* L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. **Eur J Immunol**, v. 17, n. 7, p. 1027-33, Jul 1987.

HUANG, W. *et al.* Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. **J Infect Dis**, v. 190, n. 3, p. 624-31, Aug 2004.

HYMOWITZ, S. G. *et al.* IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. **EMBO J**, v. 20, n. 19, p. 5332-41, Oct 2001.

ISHIGAME, H. *et al.* Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 108-19, Jan 2009.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nat Immunol**, v. 16, n. 4, p. 343-53, Apr 2015.

JIN, W.; DONG, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. **Emerg Microbes Infect**, v. 2, n. 9, p. e60, Sep 2013.

JONES, E. M. *et al.* Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 3, p. 348-57, Mar 1993.

KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? **Parasitol Today**, v. 12, n. 10, p. 396-9, Oct 1996.

KARASON, K. *et al.* Evaluation of CXCL9 and CXCL10 as circulating biomarkers of human cardiac allograft rejection. **BMC Cardiovasc Disord**, v. 6, p. 29, 2006.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 2, p. 210-23, Apr 1999.

KIERSZENBAUM, F.; LOPEZ, H. M.; SZTEIN, M. B. *Trypanosoma cruzi* downregulates the production of interleukin-2, interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-5 by activated human lymphocytes. **J Parasitol**, v. 82, n. 4, p. 652-6, Aug 1996.

KUCHROO, V. K. *et al.* Dysregulation of immune homeostasis in autoimmune diseases. **Nat Med**, v. 18, n. 1, p. 42-7, Jan 2012.

LACOTTE, S. *et al.* CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1173, p. 310-7, Sep 2009.

LAGUENS, R. P. *et al.* Chronic Chagas disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. **Medicina (B Aires)**, v. 41, n. 1, p. 40-3, 1981.

LANG, R. M. *et al.* Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 18, n. 12, p. 1440-63, Dec 2005.

LEE, J. *et al.* IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. **J Biol Chem**, v. 276, n. 2, p. 1660-4, Jan 2001.

LEON, B.; LUND, F. E. IL-17-producing B cells combat parasites. **Nat Immunol**, v. 14, n. 5, p. 419-21, 2013.

LEVITUS, G. *et al.* Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. **Clin Exp Immunol**, v. 85, n. 3, p. 413-7, Sep 1991.

LI, H. *et al.* Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 2, p. 773-8, Jan 2000.

LIMA, M. M. *et al.* Left ventricular diastolic function and exercise capacity in patients with Chagas cardiomyopathy. **Echocardiography**, v. 27, n. 5, p. 519-24, May 2010.

LOPES, E. R. *et al.* [A comparative study of the incidence of sudden death from Chagas' disease in Uberaba in the years 1980 and 1990]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 28, n. 2, p. 109-12, Apr-Jun 1995.

LOPES, E. R.; TAFURI, W. L.; CHAPADEIRO, E. [Morphological and quantitative studies of the dorsal vagus nerve and hypoglossus nucleus in chronic Chagas' disease with and without megaesophagus]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 11, n. 2, p. 123-9, Mar-Apr 1969.

MACHADO, F. S. *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 753-70, Nov 2012.

MACHADO, F. S. *et al.* CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis**, v. 191, n. 4, p. 627-36, Feb 2005.

MADY, C. *et al.* Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. **Circulation**, v. 90, n. 6, p. 3098-102, Dec 1994

MAGALHAES, L. M. *et al.* High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **J Infect Dis**, v. 207, n. 4, p. 661-5, Feb 2013.

MAGUIRE, J. H. *et al.* Electrocardiographic classification and abbreviated lead system for population-based studies of Chagas' disease. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 16, n. 1, p. 47-58, 1982.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, Mar 2007.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Myocardial perfusion abnormalities in chronic Chagas' disease as detected by thallium-201 scintigraphy. **Am J Cardiol**, v. 69, n. 8, p. 780-4, Mar 1992.

MARTINELLI FILHO, M. *et al.* Probability of occurrence of life-threatening ventricular arrhythmias in Chagas' disease versus non-Chagas' disease. **Pacing Clin Electrophysiol**, v. 23, n. 11 Pt 2, p. 1944-6, Nov 2000.

MARTINEZ FILHO, O. R. *et al.* [Left ventricular diastolic function in patients with Chagas' disease]. **Arq Bras Cardiol**, v. 47, n. 1, p. 31-6, Jul 1986.

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.

MATSUSHIMA, K. *et al.* Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J Exp Med**, v. 167, n. 6, p. 1883-93, Jun 1988.

MATSUSHIMA, M. *et al.* Chemokines in inflammatory and immune diseases. **Inflamm and Regener**, v. 31, n. 1, p. 11-22, 2011.

MCCABE, R. E.; MEAGHER, S. G.; MULLINS, B. T. Endogenous interferon-gamma, macrophage activation, and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Infect Dis**, v. 163, n. 4, p. 912-5, Apr 1991.

MCHUGH, T. M. Flow microsphere immunoassay for the quantitative and simultaneous detection of multiple soluble analytes. **Methods Cell Biol**, v. 42 Pt B, p. 575-95, 1994.

MILNER, J. D. IL-17 producing cells in host defense and atopy. **Curr Opin Immunol**, v. 23, n. 6, p. 784-8, Dec 2011.

MIYAZAKI, Y. *et al.* IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 185, n. 2, p. 1150-7, Jul 2010.

MOCELIN, A. O. *et al.* The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. **Eur J Heart Fail**, v. 7, n. 5, p. 869-73, Aug 2005.

MONTEIRO, A. C. *et al.* Bradykinin B2 receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by *Trypanosoma cruzi*, are critical for the development of protective type-1 responses. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 11, p. e185, 2007.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 2, p. 301-7, Feb 1992.

NABORS, G. S.; TARLETON, R. L. Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 146, n. 10, p. 3591-8, May 1991.

NOGUEIRA, L. G. *et al.* Myocardial gene expression of T-bet, GATA-3, Ror-gammat, FoxP3, and hallmark cytokines in chronic Chagas disease cardiomyopathy: an essentially unopposed TH1-type response. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 914326, 2014

NOGUEIRA, L. G. *et al.* Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 10, p. e1867, 2012.

NUNES, M. C. *et al.* Mortality prediction in Chagas heart disease. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 10, n. 9, p. 1173-84, Sep 2012.

NUNES, M. C. *et al.* Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 9, p. 767-76, Aug 27 2013.

NUNES MDO, C. *et al.* Predictors of mortality in patients with dilated cardiomyopathy: relevance of chagas disease as an etiological factor. **Rev Esp Cardiol (Engl Ed)**, v. 63, n. 7, p. 788-97, 2010.

NUNES, M. P. *et al.* Different prognostic impact of the tissue Doppler-derived E/e' ratio on mortality in Chagas cardiomyopathy patients with heart failure. **J Heart Lung Transplant**, v. 31, n. 6, p. 634-41, Jun 2012.

NYHA. **New York Heart Association. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels.** Boston: Little, Brown, 1979. 290.

OLIVEIRA, B. M. *et al.* Correlation between BNP levels and Doppler echocardiographic parameters of left ventricle filling pressure in patients with Chagasic cardiomyopathy. **Echocardiography**, v. 26, n. 5, p. 521-7, May 2009.

OMMEN, S. R. *et al.* Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. **Circulation**, v. 102, n. 15, p. 1788-94, Oct 2000.

ONISHI, R. M.; GAFFEN, S. L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. **Immunology**, v. 129, n. 3, p. 311-21, Mar 2010.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454-67, Apr 2008.

PAZIN-FILHO, A. *et al.* Minor segmental wall motion abnormalities detected in patients with Chagas' disease have adverse prognostic implications. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 4, p. 483-7, Apr 2006.

PRATA, A.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Morte súbita. In: CANSADO, J. R. e CHUSTER, M. (Ed.). **Cardiopatia chagásica.** Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, 1985.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease, **Clin Cardiol**, v. 23, n. 12, p. 883-9, Dec 2000.



RASSI, A., JR. *et al.* Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **N Engl J Med**, v. 355, n. 8, p. 799-808, Aug 2006.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; RASSI, S. G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1101-8, Mar 2007.

RASSI, A.; LORGA, A. M.; RASSI, S. G. Diagnóstico e tratamento das arritmias na cardiopatia chagásica crônica. In: CANSADO, J. R. e CHUSTER, M. (Ed.). **Cardiopatia chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, 1985.

RASSI JUNIOR, A. *et al.* [Ventricular arrhythmia in Chagas disease. Diagnostic, prognostic, and therapeutic features]. **Arq Bras Cardiol**, v. 65, n. 4, p. 377-87, Oct 1995.

REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol**, v. 140, n. 12, p. 4342-7, Jun 1988.

REED, S. G. *et al.* IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3135-40, Oct 1994.

REIS, D. D. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 5, p. 637-44, May 1993.

REIS, M. M. *et al.* An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 83, n. 2, p. 165-72, May 1997.

RIBEIRO, A. L. *et al.* Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol**, v. 9, n. 10, p. 576-89, Oct 2012.

ROCHA, M. O.; NUNES, M. C.; RIBEIRO, A. L. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 159-66, Jul 2009.

ROCHA, M. O.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. **Front Biosci**, v. 8, p. e44-54, Jan 2003.

ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M.; RIBEIRO, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 5, n. 4, p. 727-43, Aug 2007.

RODRIGUEZ-SALAS, L. A. *et al.* Echocardiographic and Clinical Predictors of Mortality in Chronic Chagas' Disease. **Echocardiography**, v. 15, n. 3, p. 271-278, Apr 1998.

ROFFE, E. *et al.* Role of CCL3/MIP-1alpha and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **Microbes Infect**, v. 12, n. 8-9, p. 669-76, Aug 2010.

ROMAGNANI S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 85, n. 1, p. 8-18, Jul 2000.

ROSSI, M. A. *et al.* Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 8, 2010.

ROTONDI, M. *et al.* Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. **Endocr Rev**, v. 28, n. 5, p. 492-520, Aug 2007.

ROTTENBERG, M. *et al.* Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand J Immunol**, v. 28, n. 5, p. 573-82, Nov 1988.

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.

ROUVIER, E. *et al.* CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. **J Immunol**, v. 150, n. 12, p. 5445-56, Jun 1993.

SAHN, D. J. *et al.* Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, v. 58, n. 6, p. 1072-83, Dec 1978.

SALVATELLA R. *et al.* South-south cooperation for Chagas disease. **Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 395-6, Aug 2013.

SAMUEL, J. *et al.* Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. **Am J Cardiol**, v. 52, n. 1, p. 147-51, Jul 1983.

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, Jul-Aug 2010.

SHEVACH E. M. Biological functions of regulatory T cells. **Adv Immunol**, v. 112, p. 137-76, 2011.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 762-74, Nov 2011.

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.

SILVA, J. S. *et al.* Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect Immun**, v. 63, n. 12, p. 4862-7, Dec 1995.

SOARES, M. B.; SANTOS, R. R. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 257-62, 1999.

SOUSA, G. R. *et al.* Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e87082, 2014.

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.

SOUZA, P. E. *et al.* 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.

STARNEs, T. *et al.* Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. **J Immunol**, v. 169, n. 2, p. 642-6, Jul 15 2002.

TAYLOR, R. Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. **JDMS**, v. 1, p. 35-9, 1990.

TALVANI, A. *et al.* Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 7, p. 943-50, Apr 1 2004.

TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance. **Adv Parasitol**, v. 76, p. 171-94, 2011.

TARLETON, R. L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 144, n. 2, p. 717-24, Jan 1990.

TARLETON, R. L. *et al.* Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 338-40, Mar 1992.

TARNOK, A. *et al.* Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. **Clin Chem**, v. 49, n. 6 Pt 1, p. 1000-2, Jun 2003.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 6, p. 262-5, Jun 2002.

TESMER, L. A. *et al.* Th17 cells in human disease. **Immunol Rev**, v. 223, p. 87-113, Jun 2008.

TORRICO, F. *et al.* Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Immunol**, v. 146, n. 10, p. 3626-32, May 1991.

TOSELLO BOARI, J. *et al.* IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002658, 2012.

TRINCHIERI, G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 677-706, 2012

VAN DEN BORNE, P. *et al.* The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 893106, 2014.

VAN VOORHIS, W. C.; EISEN, H. FI-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. **J Exp Med**, v. 169, n. 3, p. 641-52, Mar 1989.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect Immun**, v. 62, n. 11, p. 5177-82, Nov 1994.

VITELLI-AVELAR, D. M. *et al.* Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. **Scand J Immunol**, v. 62, n. 3, p. 297-308, Sep 2005.

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.

VITELLI-AVELAR, D. M. *et al.* Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scand J Immunol**, v. 68, n. 5, p. 516-25, Nov 2008.

WANG, M. *et al.* Peak early diastolic mitral annulus velocity by tissue Doppler imaging adds independent and incremental prognostic value. **J Am Coll Cardiol**, v. 41, n. 5, p. 820-6, Mar 2003.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Switzerland, 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> >. Acesso em: Jan 30 2016.

WOOD, J. N. *et al.* A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. **Nature**, v. 296, n. 5852, p. 34-8, Mar 1982.

YAO, Z. *et al.* Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. **Immunity**, v. 3, n. 6, p. 811-21, Dec 1995.

YAO, Z. *et al.* Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. **J Immunol**, v. 155, n. 12, p. 5483-6, Dec 1995.

YE, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **J Exp Med**, v. 194, n. 4, p. 519-27, Aug 2001.

YOSHIMURA, T. *et al.* Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9233-7, Dec 1987.

YOSHIMURA, T. *et al.* Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. **FEBS Lett**, v. 244, n. 2, p. 487-93, Feb 1989.

ZHANG, J.; PATEL, L.; PIENTA, K. J. Targeting chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 95, p. 31-53, 2010.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J Infect Dis**, v. 180, n. 2, p. 480-6, Aug 1999.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121-7, Feb 2000.

## ANEXOS E APÊNDICES

### Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa 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

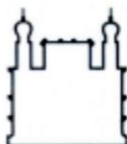
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de novembro de 2011, o projeto de pesquisa intitulado **"Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is written over the printed name.

**Prof. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

## Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqRR/FIOCRUZ



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética



### **CARTA DE APROVAÇÃO Nº 01/2012 – CEP / CPqRR / FIOCRUZ / MS**

**Protocolo CEP - CPqRR nº: 15/2011**

**Projeto de Pesquisa:** *"Identificação de marcadores imunológicos associados com a disfunção cardíaca na doença de Chagas".*

**Pesquisadora Responsável:** Juliana de 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 pela 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 Pinto Dias  
Coordenador do CEP/SH-CPqRR



## Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (grupo caso)



**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 30130-100  
 Fone: (031) 3409-9641 FAX: (31) 3409-9642



**UFMG**

Linha de Pesquisa: Fatores determinantes de morbidade e prognóstico na cardiopatia chagásica crônica.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO-CASO

#### Projeto de Pesquisa

**TÍTULO:** Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade 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 (20 mL) 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 por hemograma e outros exames a serem realizados. Além disso, a participação neste estudo poderá contribuir para o

conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença de Chagas, podendo colaborar para a melhoria do tratamento dessa doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os indivíduos não chagásicos saudáveis que constituirão o grupo-controle.

**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 enfermeiro 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, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário do paciente e gerados por este estudo, 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:** 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) – 3409-9547

Coordenadora adjunta: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (UFMG) –  
(31) 3409-3006

Colaborador: Giovane Rodrigo de Sousa – (31) 9208-1702

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com o Professor Dr. 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, 6.627 Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005, *Campus Pampulha* Belo Horizonte, MG - Brasil CEP 31270-901 ou pelo telefone (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 de 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 testemunha:

Ass. do orientando

Ass. do pesquisador responsável (orientador)

## Apêndice B - Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE (grupo controle)



**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 30130-100  
 Fone: (031) 3409-9641 FAX: (31) 3409-9642



**UFMG**

Linha de Pesquisa: Fatores determinantes de morbidade e prognóstico na cardiopatia chagásica crônica.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE

#### Projeto de Pesquisa

**TÍTULO:** Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade 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 (20 mL) 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. No seu caso, em particular, você faz parte do chamado “grupo-controle”, isto é, paciente sem história de ter contraído doença de Chagas e com exame de sangue negativo para essa doença.

**BENEFÍCIOS:** os participantes terão seu estado imunológico avaliado por hemograma e outros exames a serem realizados. Além disso, a participação neste estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença de Chagas, podendo colaborar para a melhoria do tratamento dessa doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os dos indivíduos não chagásicos saudáveis que constituirão o grupo-controle.

**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 enfermeiro 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, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário e gerados por este estudo, 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:** 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) – 3409-9547

Coordenadora adjunta: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (UFMG) –

(31) 3409-3006

Colaborador: Giovane Rodrigo de Sousa – (31) 9208-1702.

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com o Professor Dr. 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, 6.627 Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005 *Campus* Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil CEP 31270-901 ou pelo telefone (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 de 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 testemunha:

Ass. do orientando

Ass. do pesquisador responsável (orientador)