



UNIRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS

INSTITUTO BIOMÉDICO – IB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

MOLECULAR E CELULAR – PPGBMC

CARLA RENATA MORGADO DE ALMEIDA

**ANÁLISE DO PAPEL DAS CITOCINAS IL6 E IL17A E
DA AUTOIMUNIDADE NA CARDIOMIOPATIA
CHAGÁSICA CRÔNICA**

Rio De Janeiro

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
INSTITUTO BIOMÉDICO – IB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
MOLECULAR E CELULAR – PPGBMC

ANÁLISE DO PAPEL DAS CITOCINAS IL6 E IL17A E
DA AUTOIMUNIDADE NA CARDIOMIOPATIA
CHAGÁSICA CRÔNICA



PPGBMC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular do Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como pré-requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientadora:

Dr^a Patrícia Cristina dos Santos Costa

Orientando:

Carla Renata Morgado de Almeida

Rio de Janeiro

2018

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

d278 de Almeida, Carla Renata Morgado
ANÁLISE DO PAPEL DAS CITOCINAS IL6 E IL17A E DA
AUTOIMUNIDADE NA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA /
Carla Renata Morgado de Almeida. -- Rio de Janeiro,
2018.
70

Orientadora: Patrícia Cristina dos Santos Costa.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2018.

1. Autoanticorpos. 2. Autoimunidade. 3.
Cardiomiopatia Chagásica crônica. 4. Desequilíbrio
imunológico. 5. Mimetismo molecular. I. Costa,
Patrícia Cristina dos Santos , orient. II. Título.

Carla Renata Morgado de Almeida

**Análise do papel das citocinas IL6 e IL17A e da
autoimunidade na cardiomiopatia chagásica crônica**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Molecular e Celular do Instituto
Biomédico da Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora:

Dr^a Patrícia Cristina dos Santos Costa

Aprovada em: Rio de Janeiro, ___/___/_____

Banca Examinadora:

Prof^o Dr^o Adenilson de Souza da Fonseca

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

Prof^a Dr^a Giselle Pinto de Faria Lopes

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA

Prof^a Dr^a Kênia Balbi El-Jaick

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO

Agradecimentos:

Meus sinceros agradecimentos,

Ao Eterno Deus, por ter me concedido o sublime dom da vida e a força necessária para vivê-la, realizando meus projetos de vida com fé e esperança.

Aos meus pais, Maria da Penha Morgado de Almeida e Luíz Carlos de Almeida (*in memoriam*), pelo amor incondicional, pela confiança em mim depositada e pelo suporte emocional, estando sempre ao meu lado, me ensinando, diante dos diversos obstáculos da vida.

Ao meu esposo Lucas Lima de Araujo, pela compreensão, paciência, companheirismo, amor e incentivo em todos os momentos.

À minha filha Alícia Morgado Almeida Lima Araujo, por sua simples existência que me inspira a tornar-me um ser humano melhor a cada dia, pelo constante exercício de amor, paciência e sabedoria que me ensina.

A todos os meus amigos e familiares pelo carinho e pelas inúmeras risadas e por acreditarem no meu potencial.

Aos meus colegas de trabalho, pelo apoio e compreensão nas horas difíceis, e durante minhas ausências.

À Fabiana Bergamin Muccillo por seus ensinamentos e ajuda quanto à análise de citocinas.

Ao Dr. Ademir Batista Cunha por acompanhar os pacientes e ceder as informações complementares e necessárias à realização deste trabalho.

À Professora e Dr^a Patrícia Cristina dos Santos Costa, minha orientadora, pela orientação, dedicação, paciência, inspiração e amizade.

Aos Professores: Adenilson de Souza da Fonseca, Gisele Pinto de Faria Lopes e Kênia Balbi El-Jaick pela participação na banca examinadora deste trabalho.

“Não atire nas estrelas,
nós já sabemos o que há.
Atire para o espaço entre,
porque é nisto
onde está o verdadeiro mistério.”

Vera Cooper Rubin

(23/07/1928 – 25/12/2016)

Sumário:

	Página:
Folha de Apresentação	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	iii
Lista de Ilustrações	vi
Lista de Abreviaturas	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1 – Introdução	1
1.1 – Considerações Gerais	1
1.1.a - Tripanossomíase Americana	1
1.2 - Evolução Sintomática	3
1.2.a - Fase Aguda	3
1.2.b - Fase crônica	4
i. Forma indeterminada	5
ii. Forma cardíaca	6
1.3 - Gênese Da Cardiomiopatia Chagásica Crônica	8
1.4 - Resposta do Sistema Imunológico ao <i>T. cruzi</i>	10
1.5 – Autoimunidade: Interleucinas e Antirreceptores	14
2 – Objetivos	20
2.1 – Objetivos Gerais	20
2.2 – Objetivos Específicos	20
2.3 – Organograma	21
3 – Metodologia	22
3.1 - Seleção de Pacientes	22
3.2 – Coleta	22
3.3 - Citometria de Fluxo para Determinação de Citocinas	23

3.4 - Ensaio Imunoenzimático para Detecção de Autoanticorpos Contra Os Receptores Cardíacos M2ACHR E β 1AR – ELISA	23
3.5 - Análise Estatística	25
4 – Resultados	26
4.1 – Dosagem de Citocinas	26
4.2 – Relação entre Interleucinas e FEVE	27
4.3 – Dosagem de Autoanticorpos contra receptores β 1 e M2	29
4.4 – Relação entre Interleucinas e Autoanticorpos contra receptores cardíacos	30
4.5 – Relação entre FEVE e Autoanticorpos contra receptores cardíacos	32
4.6 – Comparação entre Interleucinas de Chagásicos em Função da FEVE e Controle	34
4.7 - Características Demográficas dos Pacientes Chagásicos	35
5 – Discussão	38
6 – Conclusão	45
7 - Perspectivas Futuras	45
8 – Referências	46

Lista de Ilustrações:

1.1 - Figura – Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2 – Figura - Esquema da Progressão da Doença de Chagas	7
1.4 – Figura – Diferenciação dos linfócitos T em células T efetoras	12
1.5 - Figura - Reação cruzada entre proteína P2 β -ribossomal de <i>T. Cruzi</i> e receptor M2 muscarínico cardíaco	17
2.1 – Figura - Organograma dos Objetivos	21
3.3 – Figura – Citometria de Fluxo por <i>Beads</i>	23
4.1.a - Figura – Citometria – Concentração de IL-17	26
4.1.b – Figura – Citometria – Concentração de IL-6	27
4.2.a - Figura – Relação entre FEVE e IL17	28
4.2.b - Figura – Relação entre FEVE e IL6	28
4.3 - Figura – Presença de autoanticorpos em pacientes chagásicos	29
4.4.a – Figura – Relação entre IL 17 e M2	30
4.4.b – Figura – Relação entre IL 6 e M2	31
4.4.c – Figura - Relação entre IL17 e β 1	31
4.4.d – Figura - Relação entre IL 6 e β 1	32
4.5.a – Figura - Relação entre FEVE e M2	33
4.5.b – Figura - Relação entre FEVE e β 1	33
4.6.a – Figura - Relação entre IL17 E FEVE (Comparação entre diversos grupos)	34
4.6.b – Figura - Relação entre IL6 E FEVE (Comparação entre diversos grupos)	35
4.7.a – Tabela De Características Demográficas Dos Pacientes Chagásicos	37

Lista de Abreviaturas:

- APC - Células apresentadoras de antígenos
- β 1AR - Receptor cardíaco adrenérgico β 1
- CBA - citometria por *beads* (BD *Cytometric Bead Array*)
- CCC - Cardiomiopatia Chagásica Crônica
- CHG - Pacientes chagásicos crônicos
- DO – Densidade óptica
- ECG – Eco cardiograma
- ELISA - ensaio imunoenzimático
- FEVE – Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
- GTP - Trifosfato de guanosina
- HAI - hemaglutinação indireta
- IFI - Imunofluorescência indireta
- Ig - Imunoglobulina
- IL – Interleucina
- IFN – Interferon
- M2ACHR – Receptor cardíaco colinérgico muscarínico do subtipo M2
- NK – Assassinas Naturais
- PAMPs - Padrões Moleculares Associados Ao Patógeno
- PBMC - Células Mononucleares Do Sangue Periférico
- PBS – Solução tampão Fosfato-salino
- P2 β - Proteína P2 β -ribossomal do *T. cruzi*
- SFB - Soro Fetal bovino
- T CD - Linfócitos T
- TCR - Receptor de Células T
- TGF - Fator De Crescimento Transformador
- Th - Linfócitos T Auxiliares Ou Helpers
- TNF – Fator De Necrose Tumoral
- TMB – tetrametilbenzideno
- Treg – Linfócitos T Reguladores
-

Resumo

A doença de Chagas, que tem como agente etiológico o protozoário, parasito intracelular *Trypanosoma cruzi*, é endêmica em 21 países da América Latina, onde o seu custo anual de assistência médica é cerca de US\$ 383 por paciente. Esta pode ser classificada evolutivamente em duas fases: aguda e crônica, a aguda pode ser devida à infecção primária ou a reativação de fase crônica. Cerca de 30% dos pacientes evoluem para a forma cardíaca crônica, e até mesmo os pacientes com a forma indeterminada crônica da doença podem retornar à sintomatologia, passando a desenvolver também a forma cardíaca, foco deste estudo. Esta é uma cardiomiopatia dilatada com uma miocardite rica em células T. A dissociação entre a presença de parasitas e o infiltrado inflamatório no tecido cardíaco, sugere a natureza autoimune na lesão inflamatória. Os autoanticorpos contra receptores cardíacos modulam a contratilidade cardíaca e assim a função cardíaca, e a desregulação do sistema imunológico, através do desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias contribuem para a patogenia da doença. O objetivo deste estudo foi mensurar a concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias IL6 e IL17A e os níveis de autoanticorpos contra receptores cardíacos β 1AR (β 1) e M2AChR (M2) de pacientes chagásicos crônicos, através de citometria de fluxo e de ELISA, respectivamente. Avaliou-se a associação entre estes parâmetros e a gravidade da doença, caracterizada pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), detectada ao ecocardiograma, a qual representa a função cardíaca. Os pacientes foram separados em dois grupos: com boa função cardíaca (FEVE > 50%) ou disfunção (FEVE < 50%). Este estudo observou que as citocinas IL17 e IL6 estão em maiores níveis plasmáticos (média, pg/mL) nos pacientes chagásicos (IL17 - 24.03 e IL6 - 1.415) que no grupo controle (IL17 - 10.50 e IL6 - 0.556) e que a IL17 foi associada ao grupo com melhor função cardíaca, enquanto a IL6 foi associada a uma pior função cardíaca. Esta associação entre as interleucinas foi apontada como deletéria à saúde em estudos anteriores. O que evidencia um possível papel duplo de IL17. Foi também detectada a presença de autoanticorpos em 58,82% dos pacientes chagásicos deste estudo, contudo não houve associação destes com os níveis de citocinas analisadas ou com a função cardíaca. Concluindo-se que vários mecanismos contribuem para a evolução e cronicidade da doença de Chagas, como as citocinas, e também os mecanismos de autoimunidade, o que não está totalmente esclarecido e carece de mais estudos. **Palavras chaves:** AUTOANTICORPOS. AUTOIMUNIDADE. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA. DESEQUILÍBRIO IMUNOLÓGICO. MIMETISMO MOLECULAR.

Abstract

Chagas disease, which has as its etiological agent, the protozoan parasite, the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*, is endemic in 21 countries in Latin America, where its annual history of medical care is about US\$ 383 per patient. This can be classified evolutionarily into two phases: acute and chronic, acute can be due to primary infection or chronic phase reactivation. About 30% of patients evolve to chronic cardiac form, and even patients with indeterminate of the disease can return to the symptomatology, starting to develop also the cardiac form, focus of this study. This is a dilated cardiomyopathy with a T-cell rich myocarditis. The dissociation between the presence of parasites and the inflammatory infiltrate in cardiac tissue suggests the immune nature in the inflammatory lesion. The autoantibodies against cardiac receptors modulate cardiac contractility and thus cardiac function, and the deregulation of the immune system through imbalance in the production of pro and anti-inflammatory cytokines contributes to the pathogenesis of the disease. The objective of this study was to measure the plasma concentration of pro-inflammatory cytokines IL6 and IL17A, and the levels of autoantibodies against cardiac β 1AR (β 1) and M2AChR (M2) cardiac receptors of chronic Chagasic patients, through flow cytometry and ELISA, respectively. Was evaluated the association between these parameters and the severity of the disease, characterize by the left ventricular ejection fraction (LVEF), detected on the echocardiogram, which represents the cardiac function. This study observed that the cytokines IL17 and IL6 are at higher plasma levels (average, pg/mL) in chagasic patients (IL17 - 24.03 and IL6 - 1.415) than in the control group (IL17 - 10.50 and IL6 - 0.556) and that IL17 was associated with the group with better cardiac function (LVEF > 50%), while IL-6 was associated with worse cardiac function (LVEF < 50%). This association between interleukins was pointed out as deleterious to health in previous studies. This shows a possible double role of IL17. The presence of autoantibodies in 58.82% of the chagasic patients of this study was also detected, but there was no association of these with cytokine levels analyzed or with cardiac function. It is concluded that several mechanisms contribute to the evolution and chronicity of Chagas' disease, such as cytokines, as well as autoimmunity mechanisms, which is not fully understood and requires further studies. **Keywords:** AUTOANTIBODIES. AUTOIMMUNITY. CHRONIC CHAGASIC CARDIOMYOPATHY. IMMUNOLOGICAL IMBALANCE. MOLECULAR MIMETISM.

1 - Introdução

1.1 – Considerações Gerais

1.1.a- Tripanossomíase Americana

A Tripanossomíase Americana ou também denominada Doença de Chagas tem como agente etiológico o parasito intracelular *Trypanosoma cruzi* e foi descrita e caracterizada pelo médico sanitário brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas. Este parasito infecta tanto hospedeiros vertebrados (animais silvestres e também domésticos, e até mesmo o homem), quanto invertebrados, os insetos triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiros, na transmissão em sua forma natural.

Segundo a Organização Mundial de saúde, esta doença afeta cerca de 6-7 milhões de pessoas e é endêmica em 21 países da América Latina (WHO, 2015). Mesmo a Doença de Chagas não sendo erradicável, dada a permanência do ciclo silvestre do *T. cruzi* e casos de transmissão oral, o controle adequado do barbeiro vem sendo altamente efetivo desde a década de 80. A distribuição geográfica da doença de Chagas se espalhou nas últimas décadas devido à migração, com mais de 300 mil pessoas infectadas nos Estados Unidos, conforme indicado pelas estimativas (CDC, US, 2013), mas ainda se faz necessária a vigilância para se erradicar a transmissão vetorial, em geral, o controle desta doença compete aos sistemas públicos de saúde. As infecções crônicas na América do Norte, Europa e Ásia são principalmente em consequência de transfusão de sangue contaminado, transplante de órgãos e transmissão congênita, ou vertical, que agora representa 22% de todas as novas infecções. Estima-se que mais de 8000 crianças são nascidas a cada

ano com infecção por *T. cruzi*. Cerca de 3.581.423 de pessoas infectadas por Chagas residem em países do Cone Sul, destacando-se que 1.156.821 destas vivem no Brasil (Dias, *et al.*, 2016; Matos, *et al.*, 2017; González-Tomé, *et al.*, 2018).

Dados econômicos baseados em simulações de modelo computacional indicam, que para um indivíduo com a doença de Chagas crônica, o custo anual de assistência médica é a cerca de US\$ 383 na América Latina, US\$ 1.762 na Europa e US\$ 1.162 nos Estados Unidos, Canadá e na Austrália. Com média ponderada global estimada em cerca de US\$ 474 (dólares americanos). O custo total da vida útil de um paciente crônico (despesas médicas somadas a perdas na produtividade do indivíduo) descontado para a sociedade foi de US\$ 24.245 na América Latina (Lee, *et al.*, 2013).

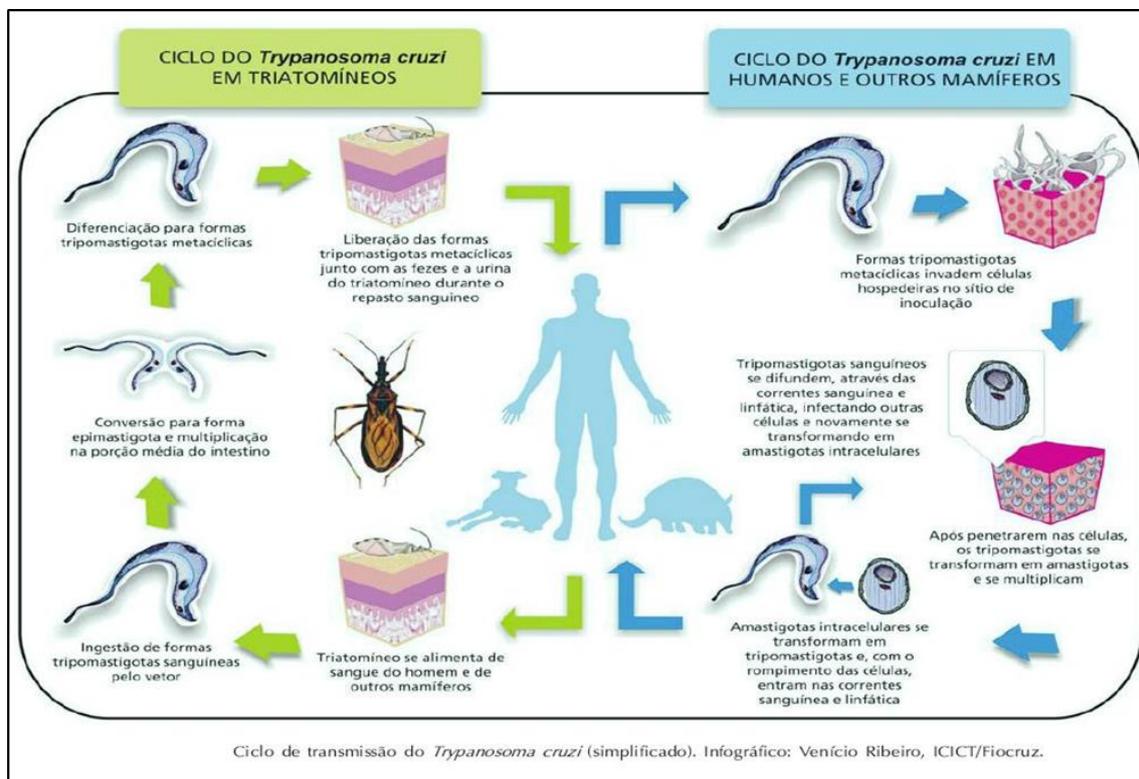


Figura 1.1 – Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*: Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* em invertebrados (silvestres) e em vertebrados (silvestres e domésticos) (Fiocruz).

Os grandes avanços no controle da Doença de Chagas não foram suficientes para sua erradicação, principalmente pelo ciclo silvestre do *T. cruzi*, através dos invertebrados como mostra a figura anterior, inicialmente, o inseto *Triatoma infestans* infectado pica o hospedeiro e defeca ao mesmo tempo. Uma solução de continuidade permite a entrada da forma tripomastigota metacíclica, presentes nas fezes, no sítio de inoculação, iniciando o ciclo do *T. cruzi* no humano, e estes invadem as células sanguíneas, onde se transformam em amastigotas, daí se multiplicam e transformam-se em tripomastigotas sanguíneos. Posteriormente, as células se rompem e os parasitas são liberados na corrente sanguínea e linfática, podendo assim invadir novas células, onde se multiplicam em amastigotas (lado direito da imagem). Os tripomastigotas sanguíneos podem também ser sugados por um novo inseto, reiniciando-se desta forma o ciclo do parasita. No tubo digestivo do inseto, os tripomastigotas sanguíneos se transformam em epimastigotas, os quais se multiplicam por divisão binária e diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (lado esquerdo da imagem). Novos elementos resultantes da interação da sociedade moderna com o meio ambiente, dos movimentos populacionais migratórios, e até mesmo o turismo, que atrai pessoas de diferentes regiões geográficas, culminaram em um novo problema epidemiológico, econômico, social e político. Assim uma moléstia latino-americana se transformou em doença global (Moncayo, 2006).

1.2 - Evolução Sintomática

1.2.a - Fase Aguda

A evolução da Doença de Chagas se dá em duas fases distintas: aguda e crônica. A fase aguda pode ser devida à infecção primária ou a reativação da

fase crônica. A fase aguda possui como característica a alta parasitemia e é pouco sintomática, ou seja, em muitos pacientes infectados por transmissão vetorial, a fase aguda não é diagnosticada.

O quadro clínico se assemelha ao de outros casos de infecção em geral, com manifestações sistêmicas pouco específicas de febre, tonteados, dor de cabeça e mal estar, podendo estar associado à miocardite ou não. Mas também podem apresentar taquicardia desproporcional, esplenomegalia e o sinal de Romaña, que é um edema subcutâneo na pálpebra, embora também possa ocorrer em outras regiões no corpo após a picada do inseto vetor. Manifestações de comprometimento cardíaco e a meningoencefalite também podem ser relatadas nesta fase, mas são raras (Marcondes & Rassi, 1994).

A maioria dos pacientes permanece com a forma assintomática, mas a persistência de parasitas muitas vezes resulta na forma crônica da doença, afetando o sistema nervoso periférico e/ou o coração dos pacientes, pois os parasitas de *T. cruzi* infectam praticamente qualquer célula, atingindo o citoplasma da mesma, onde ocorre a replicação do parasita, seguido da morte celular e disseminação de parasitas infecciosos no meio extracelular (Lescure, *et al.*, 2010; Morillo, *et al.*, 2015). Após a infecção inicial, a fase aguda da doença dura no máximo dois meses e progressivamente, observa-se a fase crônica, descrita a seguir.

1.2.b - Fase crônica

A fase crônica da doença é caracterizada pela baixa parasitemia, assim exames parasitológicos não são rotineiramente utilizados e testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos contra o *T. cruzi* devem ser empregados.

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* é confirmado (ou excluído) com pelo menos dois testes sorológicos de princípios diferentes e os mais empregados são: ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência indireta (IFI) e hemaglutinação indireta (HAI). Quando realizados os três testes, é possível obter concordância entre eles em mais de 98,0% dos soros (Saéz-Alquézar, *et al.*, 1997; Ministério Da Saúde, 2005).

Na fase crônica, quatro situações clínicas podem evoluir: a forma indeterminada, a forma cardíaca, a forma digestiva e a forma mista, que é o acometimento cardíaco e digestivo no mesmo paciente (De Andrade, *et al.*, 2011), sendo que as duas últimas não serão aqui aprofundadas. Cerca de 30 a 40% dos pacientes desenvolverá a forma cardíaca, digestiva ou mista.

i. Forma indeterminada

Os demais, cerca de 60 a 70%, permanecerão com a forma indeterminada durante toda a vida, ou esta forma pode durar entre 30 e 40 anos. Os pacientes com essa forma apresentam sorologia e/ou exames parasitológicos positivos para *Trypanosoma cruzi*, ou seja possuem anticorpos contra o parasito, mas não manifestam sintomas, sinais físicos ou evidências de lesões orgânicas (cardíacas e extracardíacas) ao ECG e à radiografia de tórax, nem em outros estudos radiológicos (esôfago e cólon), ou seja, as alterações observadas na fase aguda regridem e deixam de se manifestar (Dias, 1989). Estes pacientes não possuem o parasito circulante, permanecendo este em reservatórios teciduais locais, podendo haver recirculação do mesmo, e sem sintomas da doença, (como o próprio nome já

demonstra) ou desenvolvem desnervação do músculo parietal liso no trato digestivo (5-10%) (Cunha-Neto, *et al.*, 1996).

Mesmo que não se observe dano cardíaco evidente, vários estudos já detectam neste período da doença, a miocardite focal, bem como lesão no sistema de condução cardíaco e deficiência de contratilidade no miocárdio. Estas alterações podem ser evidenciadas com o uso de testes mais sensíveis como o eletrocardiograma de longa duração, o teste de esforço, o ecocardiograma e a biópsia endomiocárdica (Parada, *et al.*, 1997; Ribeiro & Rocha, 2000; Fuenmayor, *et al.*, 2005).

É sabido que dentre os pacientes que apresentam a forma indeterminada, ocorre um retorno à sintomatologia, anteriormente observada na fase aguda, pela recirculação dos parasitos, em aproximadamente 35% dos casos. Ainda que se observem poucos parasitos nos órgãos que são acometidos como o esôfago, cólon e predominantemente, o coração (27%) (Brenner, 1992), desenvolvendo assim a forma cardíaca crônica, a qual será discutida a seguir e é o foco deste estudo.

ii. Forma cardíaca

A forma cardíaca pode ocorrer com e sem disfunção ventricular global grave (usualmente denominada forma arritmogênica). Embora o mais comum seja a coexistência de manifestações arrítmicas com o quadro congestivo, alguns pacientes podem apresentar uma forma de cardiopatia chagásica crônica (CCC) caracterizada apenas por arritmias e distúrbios de condução intraventricular e atrioventricular, com a fração ejetora ventricular esquerda quase normal, (FEVE não alterada em exames complementares básicos). Essa arritmia ventricular maligna constitui importante marcador prognóstico devido à

morte súbita, que tem mecanismo múltiplo (taquicardia e fibrilação ventricular ou assistolia), associada a múltiplas áreas cicatriciais no miocárdio. A insuficiência cardíaca crônica habitualmente instala-se 20 anos ou mais após a infecção (Rassi, *et al.*, 1995).

Como não há vacina para a doença e o tratamento de Chagas com drogas anti - *T. cruzi* não impede a progressão da CCC, as disordens do coração são tratadas apenas sintomaticamente, quando já em fase crônica (Teixeira, *et al.*, 1990), no entanto, o uso de medicamentos como o benzonidazol, o qual é indicado na fase aguda da doença, fica a critério do médico e depende do estágio da doença no qual se encontra o paciente. Pois há estudos com dados contraditórios que mostram efeito benéfico evitando à progressão da miocardite, apesar dos diversos efeitos colaterais e da não eliminação total do parasita, ainda na fase aguda ou na reativação da doença, diferindo da fase crônica, onde outro estudo mostra não haver benefício evidente no uso deste medicamento (BENEFIT, 2015).

O esquema explicativo a seguir resume a doença de chagas desde a infecção, com o início da fase aguda, e com a progressão para a fase crônica, passando ou não pelo diagnóstico e tratamento, atingindo assim as quatro formas clínicas da mesma.

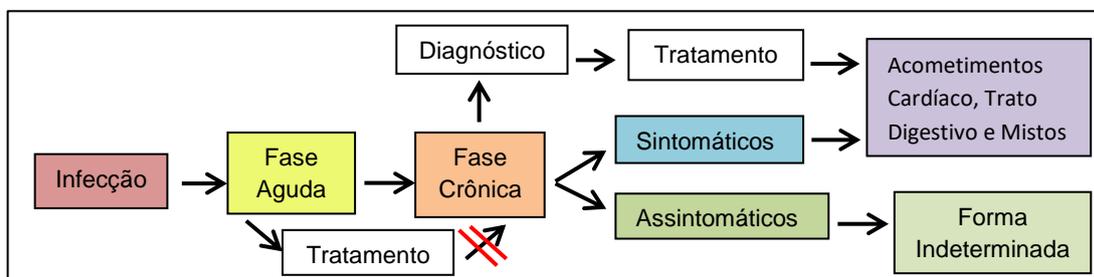


Figura 1.2 – Esquema da Progressão da Doença de Chagas: Resumo do desenvolvimento das fases e das formas clínicas da doença de Chagas desde a infecção, com uso ou não de medicamentos (adaptado de Andrade, *et al.*, 2014).

1.3 - Gênese Da Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC)

A forma cardíaca da Doença de Chagas tem progressão lenta e induz três tipos principais de alterações, e são elas: arritmias cardíacas, alterações da microcirculação e/ou evolução para insuficiência cardíaca, que podem existir associados ou não (Acquatella, 1998). A fisiopatologia da cardiopatia crônica se expressa também por alterações inflamatórias, degenerativas, fibróticas. Vários mecanismos devem contribuir para a patogenia das lesões cardíacas, além do dano direto do próprio parasita ao tecido, e a consequente instalação dos diversos distúrbios fisiopatológicos, conforme revisões anteriores (Tanowitz, *et al.*, 2009).

Dentre as alterações arritmogênicas são observadas: disfunção sinusal, bloqueios variados atrioventriculares e intraventriculares, arritmias ventriculares por reentrada, e discinergias ou aneurismas ventriculares que predisõem a complicações tromboembólicas. Assim com o progressivo dano miocárdico sobrevém a insuficiência cardíaca de padrão cardiomiopático dilatado e caracteristicamente biventricular (Acquatella, 2007).

A insuficiência cardíaca é uma síndrome complexa, resultante de alterações estruturais e funcionais, que modificam a capacidade ventricular em receber e/ou ejetar sangue, que indicam alterações de relaxamento e contração do músculo cardíaco (Krieger, 2008). Na insuficiência cardíaca vários fatores se somam resultando na falência celular, incluindo-se alterações na homeostasia de Ca^{2+} , seja na expressão gênica ou na função de proteínas e estruturas responsáveis por esta regulação, e consequentemente na contratilidade do coração, pois este íon é o regulador crucial da contração cardíaca (Bers, 2001; Guatimosim, *et al.*, 2002).

O ecocardiograma é de suma importância para o diagnóstico de cardiomiopatias, pois permite a quantificação do grau de comprometimento da função sistólica, que é um marcador de prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca, comum em pacientes com dilatação do ventrículo esquerdo, assim como é importante na detecção de alteração da contração (Kolias, *et al.*, 2000). Este exame permite a visualização de imagens detalhadas das estruturas anatômicas cardíacas e a avaliação da função cardíaca de bombear o sangue para todo o organismo, sendo o exame mais comum para esta rotina clínica, pois a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pode ser estimada a partir dos diâmetros ventriculares, calculados segundo a geometria volumétrica do ventrículo esquerdo, em sístole e em diástole (Parisi, *et al.*, 1979).

Na fase crônica assim como na fase aguda da doença de Chagas podem ser observadas alterações na microcirculação coronária. Apesar das alterações morfológicas e funcionais do sistema autonômico do coração serem detectáveis em pacientes chagásicos crônicos, elas ocorrem em intensidade variada e não se correlacionam diretamente ao grau de depressão ventricular. Estas alterações participam no processo de miocitólise e fibrose miocárdica, e admite-se que distúrbios microcirculatórios, assim como microespasmos, e a formação de microtrombos plaquetários, detectados em modelos experimentais de infecção por *T. cruzi* e em humanos com doença de Chagas, contribuam como amplificadores dos efeitos inflamatórios e produzam isquemia miocárdica, pois alteram a permeabilidade endotelial dos vasos e conseqüentemente a migração das células inflamatórias e o aporte de nutrientes para o tecido cardíaco (Marin-Neto, *et al.*, 2007; Cunha, 2012).

A cardiomiopatia chagásica crônica além de ser uma cardiomiopatia dilatada, é também uma miocardite rica de células T, uma inflamação usualmente de baixa intensidade, mas incessante, o que provoca destruição tissular progressiva e fibrose extensa no coração, principalmente pela presença de T CD8+, e que muitas vezes segue um curso fatal (Rassi, *et al.*, 1982).

A fisiopatologia da doença se desenvolve através de um complexo processo com participação de diversos mecanismos, ressaltando-se o mecanismo imunológico, onde fatores inflamatórios e de cunho autoimune podem se desequilibrar, associados à persistência do parasito no hospedeiro e à resposta aos múltiplos antígenos “transitórios” próprios (proteínas do miocárdio, como os receptores cardíacos) (Anez, *et al.*, 1999; Girones & Fresno, 2003).

1.4 - Resposta do Sistema Imunológico ao *T. cruzi*

A resposta imune ao *T. cruzi* é desencadeada pela persistência do parasito no tecido do paciente, pois o *T. cruzi* está equipado com um múltiplo aparato molecular indutor da imunidade inata, ou seja, a resposta imune natural, não específica e sem memória, através de receptores do tipo Toll, e ativa principalmente macrófagos, os quais podem atuar de diferentes formas, como células apresentadoras de antígenos (APCs) ou efectoras, na morte de parasitas (Cabral-Piccin M.P., *et al.*, 2016).

Durante o curso da doença, os padrões moleculares associados ao patógeno persistente são captados, processados e apresentados aos linfócitos pelas APCs. Esta atividade dá início à imunidade inata, resposta esta que ativa

a liberação de inúmeras citocinas pró-inflamatórias como: IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e TNF- α . É também através das APCs que outros sinais co-estimuladores são expressos durante a sinapse imunológica, ativando a cascata de células inflamatória, principalmente, T CD4+ e T CD8+, as quais se diferenciam em células T efetoras, que penetram no tecido cardíaco e medeiam a inflamação e as lesões ao tecido (Reis, *et al.*, 1993; Michailowsky, *et al.*, 2001).

Portanto, além das trocas de sinais mediados por moléculas de superfície, as APCs podem secretar diferentes citocinas, como mostrado na ilustração a seguir, as quais são centrais na definição (segundo a expressão de fatores de transcrições genéticos) do fenótipo diferenciado em populações de linfócitos T efetoras, durante a inflamação, resultando assim na resposta imune adquirida, a qual possui especificidade e memória imunológica. Então, por sua vez, as células TCD4 e TCD8 também liberam interleucinas e IFN- γ e ativam macrófagos e demais células, reiniciando assim o ciclo e ampliando a resposta imune (Nickell, *et al.*, 1993).

Neste contexto, em resposta ao patógeno, as APCs, através da liberação de IL-12 e de IL-18, induzem a diferenciação de células T para um perfil de células Th1 específicas, produtoras de IFN- γ , o qual inibe Th2 (Marino, *et al.*, 2004). Estas células e os anticorpos levam a certo controle da doença, mas não à completa eliminação do parasito do sangue ou do tecido cardíaco. Se estabelece assim um baixo grau de persistência crônica da infecção, resultando, nos assintomáticos, em uma resposta do tipo Th1 enviesada com baixa produção de IL-4, pelas Th2 (Ribeiro & Rocha, 2000).

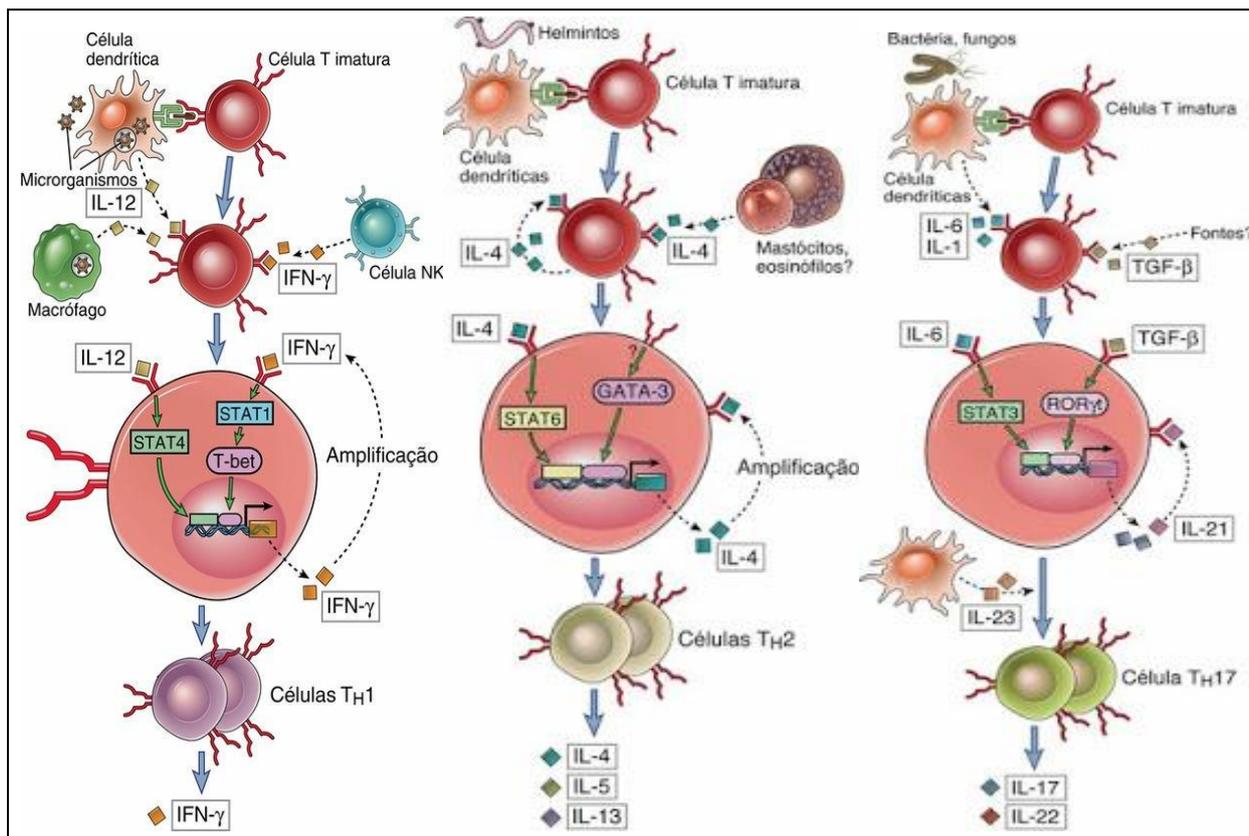


Figura 1.4 – Diferenciação dos linfócitos T em células T efectoras: Diferenciação, mediada por interleucinas, segundo fatores de transcrição gênica, dos linfócitos T clássicos em células T efectoras pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), (Abbas, *et al.*, 2015).

Entretanto nos cardiomiopatas chagásicos, o resultado apresenta uma resposta imune particularmente forte do tipo Th1 com o aumento do número de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) produtoras de IFN- γ , bem como, no plasma, as de TNF- α , os quais irão ampliar significativamente a resposta inflamatória (De Araujo, *et al.*, 2012). Desta forma, as células T efectoras, TCD4 e TCD8 ao produzirem IFN- γ e/ou ao matarem células, por parasitas, infectadas podem restringir a infecção ou promover a imunopatologias no coração, quando houver um desequilíbrio em suas produções de citocinas (Albareda, *et al.*, 2006; Silverio, *et al.*, 2012).

As células T reguladoras (Tregs) atuam como mediadores fundamentais da homeostase do sistema imune ao regular as respostas imunes inatas e adaptativas. Este papel indispensável das Tregs na tolerância imunológica periférica e na prevenção de doenças autoimunes está bem esclarecido na literatura (Saxena, *et al.*, 2014).

Assim sendo, a resposta inflamatória exacerbada, em questão, se dá quando ocorre a produção descontrolada de citocinas do tipo Th1, que pode ser também devida a uma menor atividade supressora das células Treg CD4+ CD25+ IL-10+, em menor número nos pacientes chagásicos. Ampliando desta forma a inflamação e a agressão tissular, como mecanismo imunopatológico, sugerindo-se que estas células, quando ativadas através do TCR, na presença de IL-2, são capazes de suprimir as células T, ao produzir TGF- β , IL-10 e IL-35, e podem desempenhar um papel importante no controle da intensidade da inflamação da doença de Chagas. Assim como, a própria citocina IL-10, que é imunossupressora, dentre outras citocinas de igual importância, como a IL-35, a qual suprime Th17 (Araujo, *et al.*, 2007; Nogueira, *et al.*, 2014).

Tais células, Th17, desde a sua descoberta, foram implicadas na patogênese das doenças autoimunes mais comuns, incluindo psoríase, artrite reumatóide e esclerose múltipla e outras, em modelos animais dessas doenças. Apesar dos inúmeros estudos sobre células Th17, os papéis relativos das células Treg e Th17 em conjunto, na patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica, assim como em outras doenças com a participação do viés autoimune, ainda não estão claros. Existem na literatura dados contraditórios que demonstram que não há aumento nos níveis séricos de IL17, mesmo em pacientes com insuficiência cardíaca crônica estabelecida, o que reforça o fato

de que mais estudos sobre esta citocina são necessários (Zhu, *et al.*, 2012; Edwards, *et al.*, 2015).

1.5 – Autoimunidade: Interleucinas e Antirreceptores

Ao longo dos anos, investigações clínicas e experimentais têm demonstrado que o mecanismo autoimune pode ser um dos mais importantes na evolução da patogênese da Doença de Chagas, embora este papel não esteja totalmente esclarecido. Dados sugerem que as células Th17 têm desempenho central no desenvolvimento de doenças inflamatórias e autoimunes como: asma, artrite reumatóide e lúpus (Edwards, *et al.*, 2015). Mas este papel não parece ser único, como sua função primária, visto que a IL17, produzida pelas células Th17, também media a estimulação da mobilização e recrutamento preventivo de neutrófilos, contra necrose tecidual ou sepse, diante da interface entre resposta imune inata e adaptativa, ou seja, exibe neste caso um papel protetor (Bi, *et al.*, 2007). Contudo, Sanoja e colaboradores, em modelo de infecção experimental, sugerem que esta população celular poderia ter efeito duplo; com papel protetor, em baixos níveis de infecção, e patogênico quando associado a IL-6 nos animais com alta carga parasitária (Sanoja, *et al.*, 2013).

Esta última é pró-inflamatória, estimula a síntese de proteínas de fase aguda, tem ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação, estimula a proliferação celular de neutrófilos e inibe a proliferação de células t reguladoras, sendo as células B, T e os monócitos as suas principais fontes. A IL6 também estimula a plasticidade celular das células

Th17 e segundo alguns autores, a IL6 encontra-se aumentada em ratos infectados por *T. cruzi*, assim como em humanos com a forma cardíaca crônica da doença de Chagas em comparação aos grupos de não infectados e de chagásicos com a forma indeterminada da doença em questão (Heinrich, *et al.*, 1990; Sato, 2014; Souza, 2012; Truyens, *et al.*; 1994).

As interleucinas são citocinas sintetizadas por leucócitos e atuam sobre outros leucócitos de diferentes formas, esta produção se dá em resposta a microorganismos e a antígenos diversos, mediando assim a resposta imune e a consequente inflamação. Estas têm natureza polipeptídica e também propriedade pleiotrópica, ou seja, podem gerar efeitos múltiplos em mais de um tipo celular. Iniciam suas ações pela ligação a receptores de membrana específicos nas células-alvo, estas ações consistem em alterações na expressão gênica destas células, gerando assim, a realização de novas funções e também a proliferação celular ou sua inibição, por exemplo, e estas podem ser locais ou sistêmicas (Abbas, *et al.*; 2015).

Em Chagas, os estudos iniciais relacionados à resposta imune priorizaram a resposta humoral, pois a presença de autoanticorpos, produzidos por células B, reativos a antígenos do parasita tem sido de suma importância para a caracterização da resposta imune de chagásicos. Alguns destes anticorpos, encontrados no soro destes pacientes com a forma indeterminada da doença, são denominados Líticos, e reagem a epítomos da galactose, sugerindo um papel protetor. Entretanto, outras classes de anticorpos autoreativos a estruturas específicas do próprio hospedeiro, estão relacionadas com o nível da patogenia da doença crônica, sendo capazes de ativar a proliferação celular

de linfócitos B e T, relacionadas a processos autoimunes (Dutra, *et al.*, 2005; Dutra, *et al.*, 2009).

Tem relevância o fato de que ao serem incapazes de encontrar consistentemente parasitas próximos ao infiltrado inflamatório no tecido cardíaco afetado, alguns pesquisadores sugeriram que a lesão inflamatória do coração poderia ser de natureza autoimune, possivelmente envolvendo mimetismo antigênico entre *T. cruzi* e antígenos cardíacos (Cunha-Neto, *et al.*, 1996). Esta hipótese foi reforçada pela descoberta de que as células T CD4+ de um modelo murino de CCC podem transferir lesões cardíacas a camundongos não infectados (Tibbetts, *et al.*, 1994). Em adição, Levin e colaboradores defendem também esta teoria do mimetismo molecular no aparecimento de autoanticorpos, que reconhecem a região carboxi-terminal de proteína P2 β -ribossomal do *Trypanosoma cruzi*, no soro de pacientes chagásicos com acometimento cardíaco (Levin, *et al.*, 1989; Levin, *et al.*, 1991).

E foi também demonstrado que há reação cruzada entre a porção C-terminal da proteína P-ribossomal de *Trypanosoma cruzi* e a região da segunda alça extracelular do receptor β 1-adrenérgico (Ferrari, *et al.*, 1995) e do receptor colinérgico M2 muscarínico cardíaco, como mostra a figura a seguir, esta homologia se deve tanto à sequência de aminoácidos carregados negativamente, quanto à estrutura tridimensional de ambos (Elies, *et al.*, 1996).

Esta hipótese foi corroborada por Masuda e colaboradores que observaram o bloqueio da atividade depressora da função cardíaca pela fração de imunoglobulinas G isolada de soros de pacientes chagásicos crônicos, quando previamente incubados com peptídeo correspondente à região C-terminal da proteína P-ribossomal P2 β de *T. cruzi* (Masuda, *et al.*, 1998).

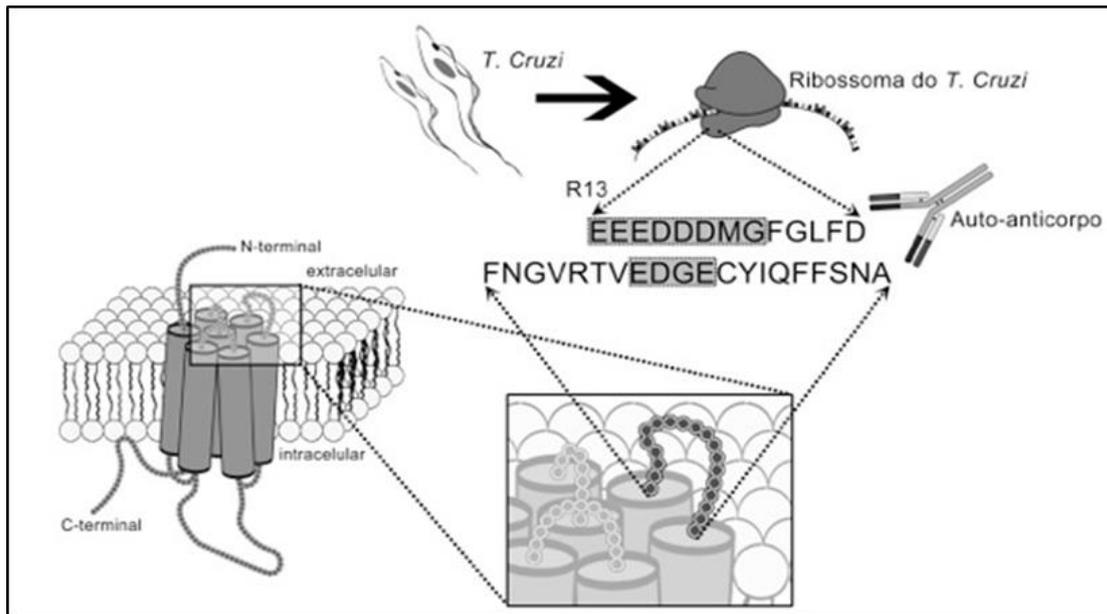


Figura 1.5 - Reação cruzada entre proteína P-ribossomal de *T. Cruzi* e receptor M2 muscarínico cardíaco: Sequência de aminoácidos da porção C-terminal da proteína P-ribossomal de *Trypanosoma cruzi* e da região extracelular do receptor colinérgico M2 muscarínico cardíaco semelhantes que induzem a reação cruzada com auto- anticorpos (Elies *et al.*, 1996).

Então, os autoanticorpos contra os receptores cardíacos $\beta 1$ e M2 acionam os mesmos de forma agonista aos seus neurotransmissores, noradrenalina e acetilcolina, ou seja, são capazes de aumentar e diminuir a frequência cardíaca respectivamente, bloqueando assim a condução atrioventricular, modificando o metabolismo celular e comprometendo a força mecânica e elétrica do coração (Costa, 2006).

As células neuronais têm a capacidade de produzir moléculas sinalizadoras, ou também conhecidas como mensageiros químicos, os neurotransmissores. As catecolaminas, grupo que inclui a adrenalina, a noradrenalina e dopamina, são sintetizadas a partir do aminoácido tirosina, já a acetilcolina é sintetizada pela colina acetil-transferase a partir da colina proveniente da alimentação ou degradação da própria acetilcolina do acetato

que o citoplasma possui. Esta capacidade sináptica somente se faz possível pela existência de moléculas receptoras, as quais formam complexos de natureza protéica capazes de se ligarem aos neurotransmissores (Lent, 2010).

Existem duas classes de receptores: os ionotrópicos, que são canais iônicos e os metabotrópicos, os quais são ativados indiretamente por meio de uma proteína intracelular, a proteína G, que liga trifosfato de guanosina (GTP), ou através de ação enzimática intracelular do próprio receptor, que fosforila canais iônicos independente dos receptores situados nas regiões adjacentes da membrana. E neste último grupo temos os receptores de acetilcolina muscarínicos (com afinidade também pela muscarina), como o subtipo M2, que se encontram em todas as células alvo do sistema nervoso parassimpático (Carvalho, 1997).

O subtipo M2 atua inibindo a adenil ciclase e assim reduzindo AMPc intracelular, além de proporcionar a ativação de canais de K⁺, e este fluxo de potássio é hiperpolarizante e gera um potencial inibitório, diminuindo a frequência cardíaca. Os receptores β_1 também usam o AMPc como mensageiro, e são ativados por noradrenalina, porém atuam ativando a adenil ciclase, e desta forma, geram o aumento da produção de AMP cíclico e finalmente a ativação da PKA, que fosforila os canais de cálcio dependentes de voltagem na membrana, ocasionando a despolarização e posteriormente contração da célula cardíaca (Chiale, *et al.*, 1994; Lent, 2010). Resultando assim em um aumento da frequência cardíaca e da força de contração muscular celular. Então, os autoanticorpos que reagem contra os receptores cardíacos desempenham um papel importante na patogenia da doença de Chagas crônica, pois levam à disfunção e à lesão das fibras miocárdicas,

mantendo um efeito estimulante das células cardíacas por muito mais tempo, que os seus agonistas neuro-humorais.

Há inequívoca evidência de que reações patogênicas de autoimunidade ocorram na cardiomiopatia chagásica crônica, por mimetismo molecular, ativação policlonal ou outros mecanismos. Entretanto, não existem evidências diretas que mostrem se agressão às estruturas cardíacas dependente de autoimunidade é decisiva para instalação das lesões características da cardiomiopatia crônica da Doença de Chagas. Em contrapartida, admite-se que a eficiência de mecanismo adequado de imunorregulação seja fator crucial para se diferenciar os indivíduos que controlariam sua infecção sem desenvolver dano tecidual importante (através de resposta inflamatória limitada) daqueles que evoluiriam com doença grave, com inflamação intensa, necrose e fibrose reativa (De Andrade, *et al.*, 2011; Dutra, *et al.*, 2008).

Vale ressaltar também que tanto a imunidade humoral ou adquirida, quanto a celular ou inata, estão envolvidas na cardiomiopatia chagásica crônica e que as citocinas representam a chave de orquestramento desta patologia (Teixeira & Santos-Buch, 1975). Em consonância, considerando-se a relevância das interações parasito-hospedeiro, raramente apenas um viés do sistema imunológico será relacionado com a evolução da doença de chagas. Como também pela própria complexidade do ciclo biológico do *T. cruzi*, o controle da infecção, bem como a progressão da doença se dão com o envolvimento de vários níveis do sistema imunológico. E por isso se faz extremamente necessário à análise da resposta imunológica frente ao desafio com o parasito ou com seus epítomos, clínica e experimentalmente.

2 - Objetivos

2.1 – Objetivos Gerais

- Estudar o papel de citocinas IL6 e IL17 e da autoimunidade e a disfunção contrátil de pacientes chagásicos crônicos.

2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar os níveis de IL-17 e de IL-6 circulantes, em pacientes chagásicos crônicos (CHG), por citometria de fluxo.
- Estabelecer relação com a cronicidade da doença, através da relação entre os níveis de IL-17 e IL-6 com o cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), que mede a função cardíaca, dado por ecocardiograma.
- Dosar as concentrações de autoanticorpos contra receptores acoplados a proteína-G em pacientes chagásicos crônicos, em ensaio imunoenzimático para avaliação da autoimunidade.
- Relacionar as concentrações de autoanticorpos à função cardíaca, através da FEVE (baixa: < 50% e alta: > 50%), obtida por ecocardiograma.
- Relacionar os níveis de autoanticorpos detectados nos pacientes chagásicos com os níveis de IL-17 e IL-6 observados nos mesmos.

2.3 – Organograma dos Objetivos

Os Objetivos específicos foram esquematizados em um organograma, a seguir, para melhor compreensão dos mesmos.

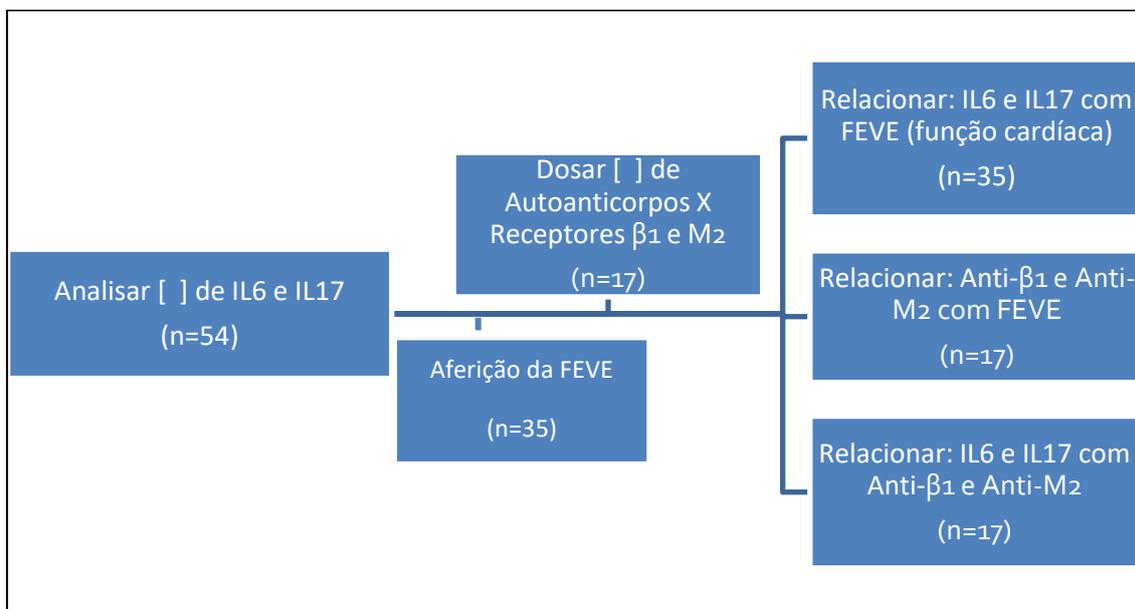


Figura 2.3 – Organograma dos Objetivos específicos, com respectivos números de pacientes (amostras) obtidos em cada metodologia.

3 - Metodologia

3.1 - Seleção de Pacientes

Foram selecionados 54 (35 com FEVE aferida) pacientes do Ambulatório de Cardiopatia Chagásica do Instituto Nacional de Cardiologia. Para avaliação da função cardíaca e cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foi utilizado o ecocardiograma convencional. Foram incluídos no estudo 21 pacientes com disfunção ventricular caracterizada por FEVE < 50% (cardiopatia severa) e 14 pacientes com FEVE > 50% (cardiopatia leve ou ausente). Sendo a FEVE dada pela fórmula a seguir descrita:

$$FEVE = \frac{VDF - VSF}{VDF} \cdot 100\%$$

Onde:

VDF: Volume Diastólico Final
VSF: Volume Sistólico Final

Como controle foram convidados 5 doadores de sangue sem doença cardíaca para participarem do estudo doando sangue para análise.

3.2 - Coleta

10 mL de sangue periférico foi coletado em tubos sem anticoagulante, e o soro foi separado através de centrifugação, por 20min com gradiente de centrifugação (2000 rpm), 450g, 18 a 20°C, com 2 min de aceleração e desaceleração, tanto dos pacientes chagásicos, quanto dos doadores não infectados com *T. cruzi*. O soro obtido foi congelado em -20°C para análise posterior: dosagem de citocinas e autoanticorpos contra os receptores cardíacos M2 e β 1.

3.3 – Citometria de Fluxo para Determinação de Citocinas

Utilizamos Kit CBA de citometria por *beads* (BD *Cytometric Bead Array* (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit) para mensurar citocinas, segundo o protocolo do fabricante. Neste ensaio de captura de analítos solúveis com grânulos de tamanho e fluorescência conhecidos, conjugados a anticorpos específicos, gera um sinal fluorescente proporcional à quantidade observada na curva padrão, como mostrado na figura a seguir. Analisamos, desta forma, neste estudo, os níveis de interleucinas IL-6 e IL-17.

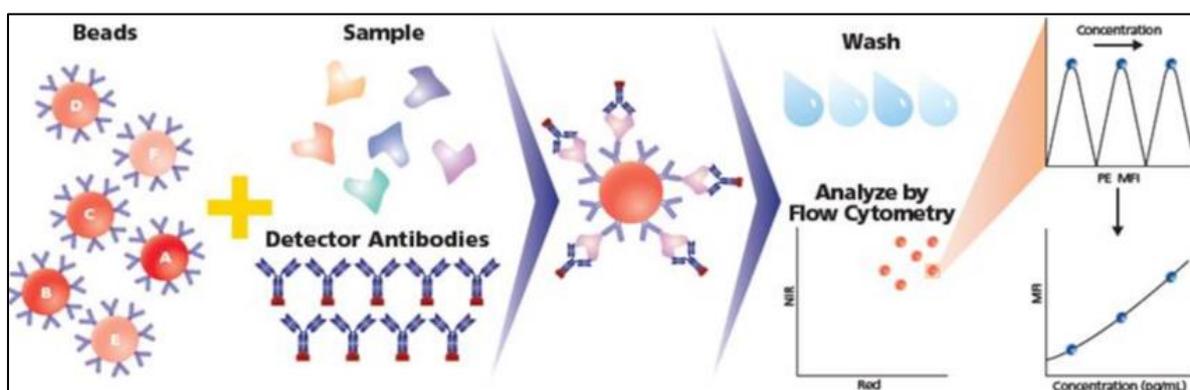


Figura 3.3 – Citometria de Fluxo por *Beads*: Para a dosagem das citocinas IL6 e IL17A Kit CBA de citometria por *beads* (BD *Cytometric Bead Array* (CBA) Human Th1/ Th2/ Th17 Cytokine Kit).
Fonte: <https://www.researchgate.net/figure/Figuur10CytometricbeadassayprocedureOrmenese>.

3.4 - Ensaio Imunoenzimático para Detecção de Autoanticorpos Contra os Receptores Cardíacos M2ACHR (M2) E β 1AR (β 1) – ELISA

Microplacas de 96 poços foram adsorvidas com 1 μ g por poço dos peptídeos correspondentes à segunda alça extracelular dos receptores β 1-adrenérgico (β 1AR) H26R ou receptor de acetilcolina subtipo M2 (M2AchR) em

solução de bicarbonato (50mM; pH 9,6), durante aproximadamente 18h de incubação a 4°C.

Seguindo-se para lavagem com PBS-T e bloqueio de sítios inespecíficos da placa com 200 µL de solução de bloqueio (PBS contendo Tween 0,1% e Albumina de soro bovino 2%) e incubação à temperatura ambiente por 2 horas. A seguir, foram adicionados 50 µL dos soros em teste (1:100 B1 ou 1:200 M2) em triplicata, previamente diluídos em PBS-T, Soro Fetal bovino (SFB) 5% - anticorpo primário.

As microplacas foram então incubadas por 2 horas a 37°C em estufa. Após extensiva lavagem foram adicionados 50µl de Anti IgG de humano biotilado (Zymed), anticorpo secundário (1:5000 em PBS-T) e o sistema foi incubado por 1 hora a 37°C em estufa. Após nova lavagem, a solução de avidina-peroxidase (1:5000) foi adicionada, sendo mantida no escuro por 30 min à temperatura ambiente, seguindo-se novamente a lavagem.

A revelação foi realizada com TMB (tetramethylbenzidine) (Zymed) por 5 minutos, à temperatura ambiente, sendo a reação interrompida por HCL. A leitura de densidade ótica (DO, $\lambda=450\text{nm}$) foi determinada em leitora de microplacas (Spectramax, Molecular Devices).

O ponto de corte foi previamente estabelecido em experimentos de titulação, cut-off: 1.054 para $\beta 1$, e cut-off: 1.297 para M2. Neste ensaio identificamos o ponto de corte e a diluição para caracterização de resposta de autoanticorpos em pacientes chagásicos e normais. Esta análise foi realizada com o soro com 100 chagásicos e 100 controles (dados não mostrados).

3.5 - Análise Estatística

Todas as análises estatísticas usaram o programa de gráfico GraphPad Prism 5.

O teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para análise de distribuição.

Para determinar a comparação entre os grupos estudados, dois a dois, foi utilizado o Teste t de Student ou teste não-paramétrico de Mann-Whitney, quando a variável se apresentou com distribuição normal ou não, respectivamente.

Assim, também o de Kruskal Wallis e o pós teste de Dunn foram utilizados para comparação entre mais de dois grupos.

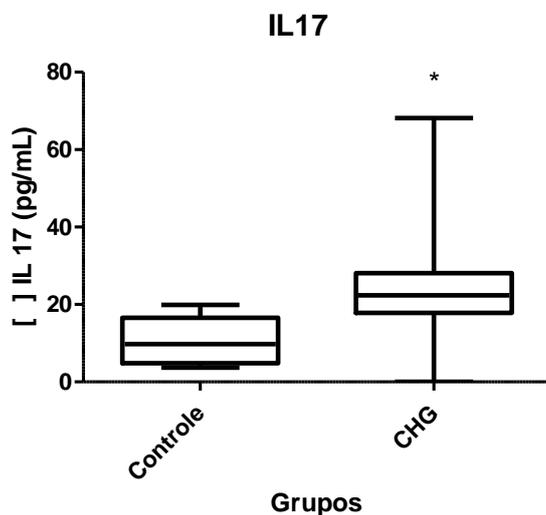
Foi adotado o valor de significância menor de 5%.

4 – Resultados

4.1 – Dosagem de Citocinas (IL17 e IL6):

O gráfico da figura 4.1.a mostra que os níveis plasmáticos de IL17 foram maiores no grupo de pacientes chagásicos (n=54), que no grupo controle (n=5), obtendo-se $p = 0.0069$ e média \pm SD = 24.03 ± 15.25 . E no gráfico da figura 4.1.b observa-se, através do mesmo tipo de experimento, citometria de fluxo, que as concentrações plasmáticas de IL6 são maiores no grupo de chagásicos que no grupo controle, sendo mesmos os valores de n para os respectivos grupos, obtendo-se então $p = 0.0093$ e média \pm SD = 1.415 ± 1.058 , ambos com distribuição normal.

4.1.a



4.1.b

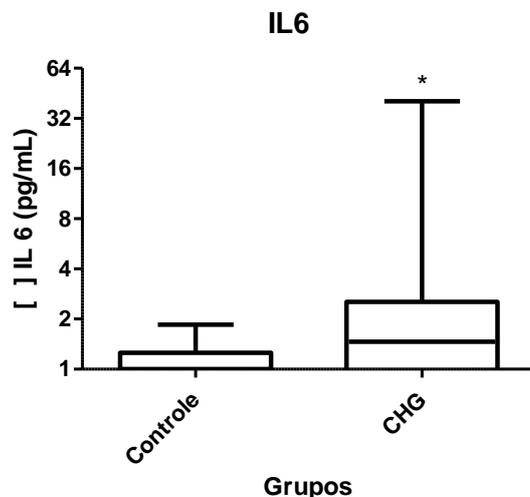


Figura 4.1: Nível plasmático de citocinas nos grupos controle e chagásico (CHG). **a.** Gráfico tipo diagrama de caixa com concentração plasmática de IL-17; *($p=0.0069$). **b.** Gráfico tipo diagrama de caixa com concentração plasmática de IL6; *($p=0.0093$).

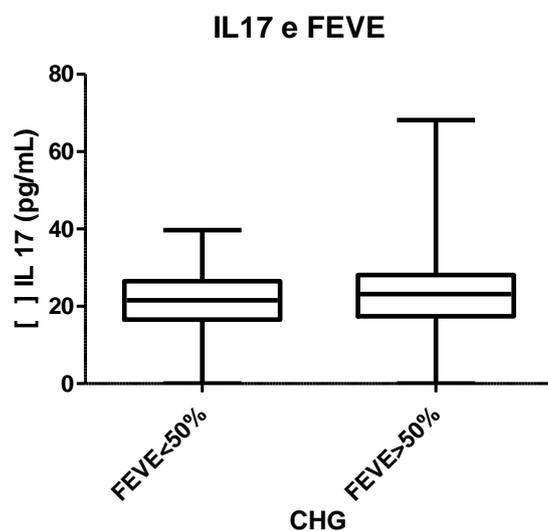
4.2 – Relação entre Interleucinas (IL17 e IL6) e FEVE:

Para relacionar os níveis de concentrações plasmáticas das interleucinas em análise com a função cardíaca, foi realizada a subdivisão do grupo de pacientes chagásicos em dois grupos menores o primeiro ($n=21$), com uma função cardíaca pior (FEVE < 50%), ou seja, cardiomiopatia severa e o segundo ($n=14$), com função cardíaca melhor ou normal (FEVE > 50%), ou seja, disfunção cardíaca mais branda ou ausente. Assim sendo, no gráfico da figura 4.2.a observa-se que a concentração de IL17 era similar nos grupos analisados, obtendo-se $p= 0.6723$.

Entretanto a partir do gráfico da figura 4.2.b observa-se que a concentração de IL6 foi significativamente maior no grupo de chagásicos com pior função cardíaca, caracterizada pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo inferior a 50%, obtendo-se $p= 0.0044$. A análise da FEVE (%), feita

através de ecocardiograma, teve distribuição normal, com média \pm SD = 59.3 ± 18 , (dados brutos não mostrados).

4.2.a



4.2.b

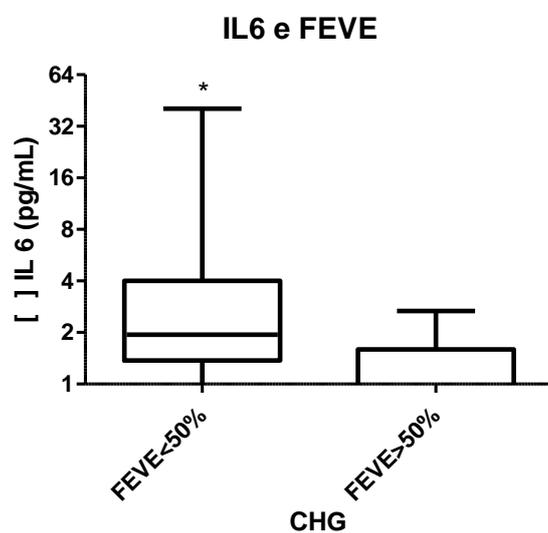


Figura 4.2: Nível plasmático de citocinas nos grupos chagásicos com FEVE inferior e superior a 50%. **a.** Gráfico tipo diagrama de caixa com concentração plasmática de IL-17 em relação a FEVE. ($p=0.6723$). **b.** Gráfico tipo diagrama de caixa com concentração plasmática de IL-6 em relação a FEVE. ($p=0.0044$).

4.3 – Dosagem de Autoanticorpos contra receptores M2AChR (M2) e β 1AR (β 1):

Através de ensaio imuno enzimático – ELISA – obteve-se o seguinte resultado, dentro do grupo de chagásicos (n=17), da análise da presença de autoanticorpos contra receptores cardíacos: 2 pacientes chagásicos positivos para β 1, (*cut-off: 1.054); e 6 pacientes chagásicos positivos para M2, (*cut-off: 1.297). E ainda 2 pacientes duplo positivo, ou seja, reagindo tanto contra M2, quanto contra β 1; totalizando 10 pacientes que apresentaram auto reatividade para os receptores em questão; e 7 foram duplo negativos (não reagiram).

Presença de Autoanticorpos em Pacientes Chagásicos

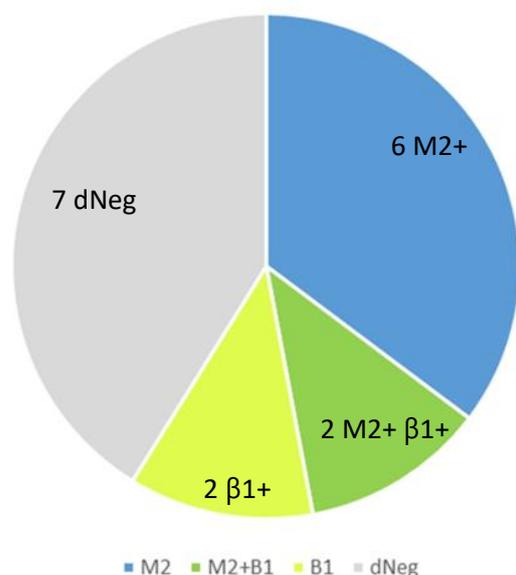


Figura 4.3: ELISA – (DO= λ 450nm) - Presença de autoanticorpos: anti M2+: 6; anti β 1+: 2; anti M2+ anti β 1+: 2; dNeg: 7. A presença de autoanticorpos foi detectada em 58,82% (10 pacientes) dos pacientes chagásicos deste ensaio.

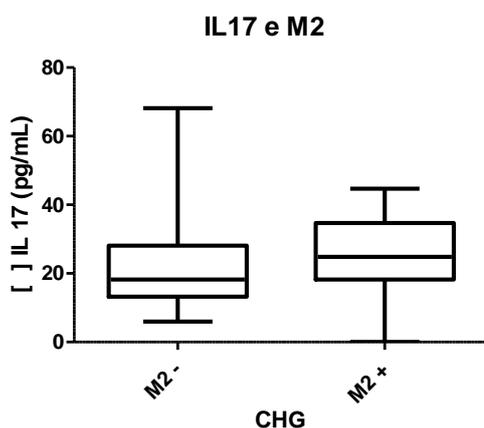
Estas análises não tiveram distribuição normal e por isso obtêm-se as medianas e percentis a seguir: DO M2 1.346 [1.036 – 2.023] e DO β 1 0.865 [0.791 – 1.061]. Observa-se que os autoanticorpos foram detectados no soro da maioria (58,82%) dos pacientes chagásicos do estudo.

4.4 – Relação entre Interleucinas (IL17 e IL6) e reação de autoanticorpos contra receptores cardíacos M2AChR (M2) e β 1AR (β 1):

Observa-se que a concentração de IL17 se apresentou similar nos pacientes chagásicos independente da resposta anti muscarínica M2 em seu soro ou não. $p= 0.1786$, mostrado no gráfico da figura 4.4.a. Da mesma forma as concentrações de IL6 dentro do mesmo grupo, igualmente, não apresentaram significância, em comparação entre pacientes que reagiram contra o M2 e aqueles que não reagiram, obtendo-se $p= 0.5909$, mostrado no gráfico da figura 4.4.b, porém os dados destas análises se apresentaram com maior amplitude no grupo de chagásicos M2⁻.

Assim, pode-se observar também a partir do gráfico da figura 4.4.c que a concentração de IL17 não sofre alteração significativa em relação à presença de autoanticorpos contra o receptor cardíaco β 1, obtendo-se $p= 0.6951$. Igualmente, a concentração de IL6 não teve diferença significativa quando se compara, dentre os chagásicos, os reagentes positivos e negativos para este mesmo receptor cardíaco, obtendo-se $p= 0.9432$, mostrado no gráfico 4.4.d. Ambas análises apresentam maiores amplitudes nos chagásicos β 1⁻.

4.4.a



4.4.b

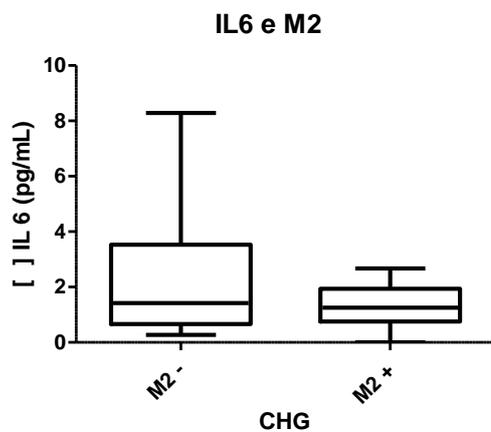
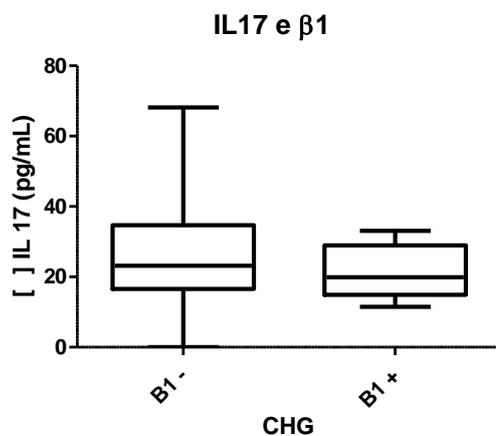


Figura 4.4: Nível plasmático de citocinas nos grupos chagásicos com autoanticorpos contra receptor cardíaco muscarínico M2. **a.** Gráfico tipo diagrama de caixa com concentração plasmática de IL-17 em relação a autoanticorpos contra M2. ($p=0.1786$). **b.** Gráfico tipo diagrama de caixa com concentração plasmática de IL-6 em relação a autoanticorpos contra M2. ($p=0.5909$).

4.4.c



4.4.d

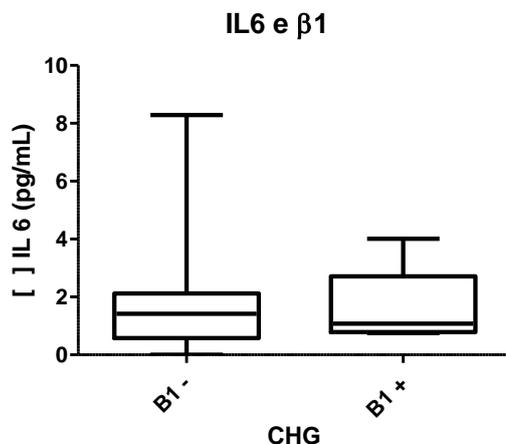


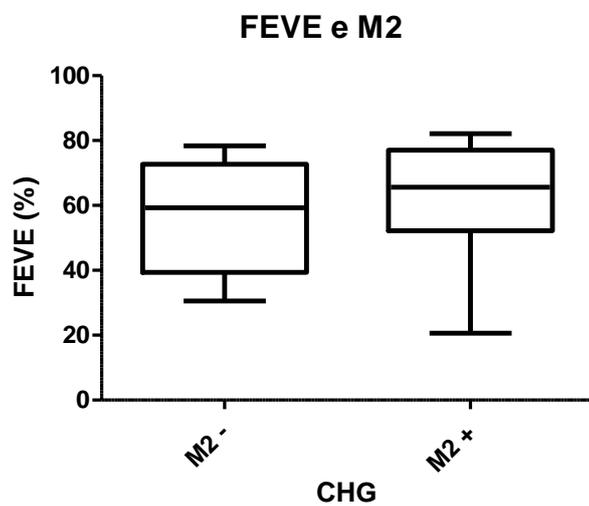
Figura 4.4: Nível plasmático de citocinas nos grupos chagásicos com autoanticorpos contra receptor cardíaco $\beta 1$. **c.** Gráfico tipo diagrama de caixa com concentração plasmática de IL-17 em relação a autoanticorpos contra $\beta 1$. ($p=0.6951$). **d.** Gráfico tipo diagrama de caixa com concentração plasmática de IL-6 em relação a autoanticorpos contra $\beta 1$. ($p=0.9432$).

4.5 – Relação entre FEVE e reação de autoanticorpos contra receptores cardíacos M2AChR (M2) e $\beta 1AR$ ($\beta 1$):

Quando se avalia a relação entre a função cardíaca, através do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e a presença ou ausência de autoanticorpos contra receptores cardíacos, obtém-se os seguintes resultados: em relação ao receptor M2, a FEVE, dos pacientes que reagiram e daqueles que não reagiram, não teve diferença significativa, obtendo-se $p= 0.5893$, mostrado em 4.5.a.

Assim como, em relação ao receptor $\beta 1$, a FEVE destes pacientes também não apresentou diferença significativa entre os que reagem dos que não reagem contra o receptor em análise, obtendo-se $p= 0.3355$, mostrado no gráfico da figura 4.5.b.

4.5.a



4.5.b

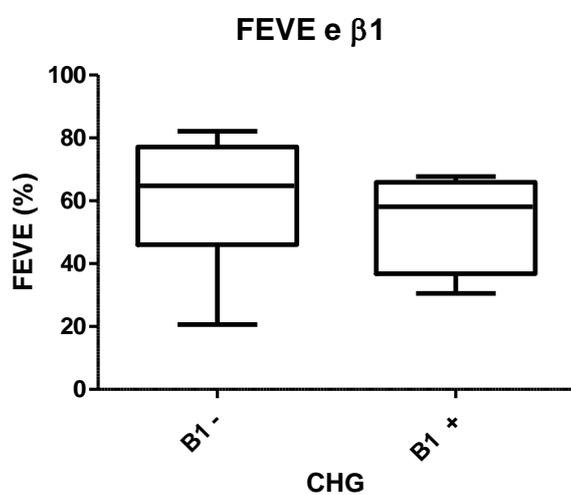


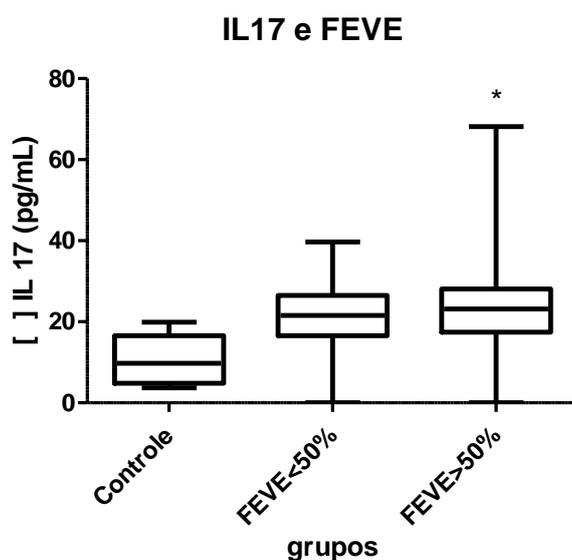
Figura 4.5: Relação entre FEVE e reação de autoanticorpos contra receptores cardíacos. **a.** FEVE analisada levando-se em consideração à presença de autoanticorpos contra receptor cardíaco M2. ($p= 0.5893$) **b.** FEVE analisada levando-se em consideração à presença de autoanticorpos contra receptor cardíaco β 1. ($p= 0.3355$)

4.6 – Comparação entre Interleucinas (IL17 e IL6) de Pacientes Chagásicos e do Grupo controle em função de FEVE:

Ao comparar os níveis de IL17 dos pacientes chagásicos em subgrupos segundo a função cardíaca e do grupo controle, não se observa diferença significativa entre os subgrupos de chagásicos, porém ao se comparar a concentração de IL17 dos chagásicos com melhor função cardíaca, ou seja, FEVE > 50%, em relação a do grupo controle, encontra-se significância, obtendo-se $p=0.0350$, mostrado no gráfico da figura 4.6.a.

Ademais quando se compara os níveis plasmáticos de IL6, dos chagásicos separados em função da FEVE, e do grupo controle, tem-se que a concentração de IL6 no grupo de chagásicos com pior função cardíaca, ou seja, cardiomiopatia severa (FEVE < 50%) é significativamente maior tanto em relação ao grupo chagásico com FEVE > 50%, quanto em relação ao grupo controle, observando-se $p=0.0015$, mostrado no gráfico da figura 4.6.b.

4.6.a



4.6.b

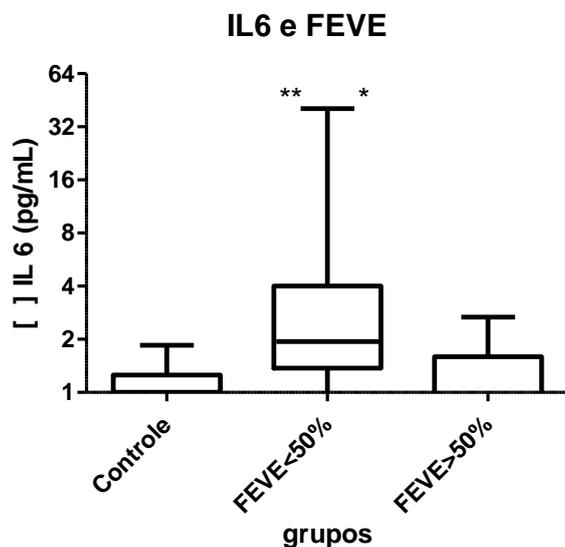


Figura 4.6: Comparação entre Concentrações de Interleucinas de Pacientes Chagásicos e do Grupo controle em função de FEVE. **a.** Relação entre as concentrações de IL-17 e FEVE: Pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0.0350$); Pelo pós teste de Dunn: *Grupo chagásico com FEVE > 50% x grupo controle ($p<0.05$). **b.** Relação entre as concentrações de IL-6 e FEVE: Pelo teste de Kruskal-Wallis ($p=0.0015$); Pelo pós teste de Dunn: *Grupo chagásico com FEVE < 50% x Grupo chagásico com FEVE > 50% ($p<0.05$); e **Grupo chagásico com FEVE < 50% x grupo controle ($p<0.05$).

4.7 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES

CHAGÁSICOS:

A tabela demográfica a seguir mostra os dados obtidos da pesquisa experimental, como a média e a mediana dos diversos parâmetros analisados, de uma amostra de 17 chagásicos.

Nesta podemos observar que em média esta coorte possui 69 anos de idade, ou seja, é idosa, dado este importante a se considerar como sendo um fator imuno-influenciador, devido à senescência imunológica, processo este

associado ao progressivo declínio das funções imunológicas e consequente aumento da suscetibilidade a infecções, a doenças autoimunes e ao câncer (Le Saux, *et al.*, 2012).

Observa-se que a maior parte do grupo (58,8%) é composta por indivíduos do sexo feminino, fator este de suma importância, pois as mulheres tendem a sofrer mais intensamente com desregulações hormonais, que também influenciam as respostas imunológicas. E sem falar que os ditos hormônios sexuais femininos, como os estrógenos são estimuladores do sistema imune, enquanto os masculinos, como os andrógenos, são depressores ou “reguladores” da atividade imune. Existem dados na literatura demonstrando que com a diminuição dos estrógenos no período pós-menopausa, há uma diminuição na atividade das células T e NK (Olsen & Kovacs, 1996). Então, a desregulação das respostas imunológicas, assim como o processo de senescência imune estão ligados à idade e ao gênero.

Pode-se observar também que em média este grupo tem a função cardíaca caracterizada por FEVE = 59.3(%)

Assim como, que as médias dos níveis plasmáticos das interleucinas analisadas foram: IL17 – 24.03 pg/mL e IL6 – 1.415 pg/mL; Tendo, todos estes dados, distribuição normal.

Entretanto, a análise da densidade óptica, por ELISA, de autoanticorpos contra receptores cardíacos M2 e β 1, não teve distribuição normal, então pode ser observado suas respectivas medianas: DO M2 - 1.346 e DO β 1- 0.865 na tabela.

Tabela Demográfica

Características:	Média ± SD ou Mediana; [Percentis]:
Idade (anos)	69 ± 13
Gênero Feminino (%)	58,8
FEVE (%)	59.3 ± 18
IL-17 (pg/mL)	24.03 ± 15.25
IL-6 (pg/mL)	1.415 ± 1.058
DO M2 (DO 450nm)	1.346; [1.036 – 2.023]
DO β1 (DO 450nm)	0.865; [0.791 – 1.061]

Tabela 4.7.a - Dados demográficos de 17 pacientes chagásicos, os quais realizaram todos os exames e os experimentos do presente estudo. A tabela mostra as médias e medianas, assim como os respectivos desvios padrões e percentis dos dados analisados no presente estudo.

5 – Discussão

A eficiência da resposta imune, de forma limitada, suficiente e benéfica depende principalmente da produção ordenada e equilibrada de citocinas pró e anti-inflamatórias, portanto qualquer desequilíbrio nesta chave de orquestração imune pode desencadear mecanismos deletérios à saúde, como doenças alérgicas ou inflamação crônica, ou até mesmo doenças autoimunes. Deste modo tem-se que a miocardite infecciosa não somente é devida ao parasita causando as lesões teciduais, mas também ocorre por um desequilíbrio na produção de citocinas.

É sabido que as citocinas pró-inflamatórias agem ativando macrófagos, e também estimulam a diferenciação e produção de células Th1 e orquestram as T CD8+, citotóxicas, que destroem o tecido e provocam fibrose (Reis, *et al.*, 1993). Já as citocinas anti-inflamatórias regulam negativamente a resposta imune, assim como as células Tregs, as quais são conhecidas pela manutenção da tolerância imunológica e pelo controle das imunopatologias (Almeida, *et al.*, 2018). E estudos anteriores afirmam que os linfócitos de pacientes chagásicos crônicos produzem mais IL-6, IFN- γ e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias, associadas à reação inflamatória intensa em chagásicos (Dutra, *et al.*, 2009), porém pouca ou nenhuma IL-4 ou IL-10, anti-inflamatória, quando comparados com indivíduos assintomáticos (Guedes, *et al.*, 2010). Isto indica um desequilíbrio na resposta imunológica por parte dos chagásicos.

Neste estudo observou-se que o perfil de resposta imunológica através de citocinas do tipo IL17 e IL6 foi maior em pacientes chagásicos que no grupo controle. E sabe-se que a IL17 inibe a reconstrução do coração através da fibrose miocárdica, pela reduzida síntese de colágeno intracelular com ativação

de metaloproteinases (Li, *et al.*, 2016). Sabe-se também que a maior concentração da IL6 nos pacientes chagásicos foi associada a uma resposta imunológica mais severa, relacionada a pacientes que desenvolvem a forma cardíaca crônica da doença, e não aos pacientes que permanecem na forma indeterminada da mesma, com reação imune limitada (Dutra, *et al.*, 2009; Souza, 2012).

As células T dos pacientes chagásicos são capazes de se proliferar *in vitro* em resposta a antígenos do *T. cruzi* (Dutra, *et al.*, 2000). Pode-se então afirmar, com base nos resultados do presente estudo, que o perfil celular com maior taxa proliferativa, nos pacientes chagásicos, é de células T Helper, a saber, Th17, conhecidas por induzir respostas inflamatórias e autoimunidade e por serem as principais produtoras de IL-17, em maior concentração em chagásicos (Graeber, *et al.*; 2012)? Não diretamente, por dois motivos: primeiramente, não foi feita análise de proliferação celular e sim de concentração de citocinas plasmática, e porque se sabe também, que em casos de desregulação imunológica, quer seja por causa de exaustão clonal de Treg, em menor número em chagásicos crônicos (Almeida, *et al.*, 2018), quer seja pelo desequilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias, como o aumento de IL6, vias alternativas para a produção de IL17 são ativadas através da plasticidade celular imunológica, ou seja, a produção de IL-17 pode ocorrer através de outras células como NK, monócitos, neutrófilos e T CD8+ (Gaffen, 2016; Iwakura, *et al.*, 2011; Miyazaki, *et al.*, 2010; Sato, 2014; Villani, *et al.*, 2010), além das clássicas Th17, apesar de majoritariamente por estas últimas, e mais recentemente descoberto, também pelas células B (Bermejo, *et al.*, 2013), mesmo sendo esta citocina considerada pró inflamatória, estando relacionada com infecções severas e autoimunidade.

Porém sabe-se que a resposta do tipo Th1 como também a do tipo Th17 estão concomitantemente presentes na doença de Chagas, como já elucidado anteriormente, pois as Th17 são eficientemente geradas na presença de TGF- β e IL-6, o aumento da frequência destas células foi descrito em modelos experimentais para doenças autoimunes e doenças infecciosas (Wang, *et al.*, 2013; Whibley, *et al.*, 2014), e este experimento mostra que a IL6, a qual é pró-inflamatória, é maior no grupo de chagásicos que no grupo de não infectados pelo parasito. Assim como, já citado em outros estudos que o IFN- γ é maior nos chagásicos e é secretado pelas Th1 (Muranski & Restifo, 2013). Adicionalmente, sabe-se também que os pacientes chagásicos possuem uma frequência menor de células Th2, pois estas têm sua diferenciação inibida pelas citocinas produzidas pelas Th1, e necessitam de IL4, pouco produzida, para sua diferenciação, como também possuem uma menor frequência de Tregs, visto que estas secretam IL-10, que é imunossupressora e pouco produzida pelos pacientes chagásicos (Li & Flavell, 2008). Então, existem indícios fortes de um componente desregulador na resposta imune durante a miocardite chagásica, principalmente pela insuficiente proliferação de Treg, como previamente citado e mostrado em estudos anteriores, desregulando a proliferação de Th17, e conseqüente produção da IL17. Sabendo-se que a homeostase imunológica depende da via de desenvolvimento recíproco das células Treg e Th17 (Zhou, *et al.*, 2009).

Os pacientes chagásicos crônicos tiveram valores significativamente maiores de IL-17 e de IL-6 produzidas, que os não infectados por *T. cruzi*, e esta interação de citocinas, foi apontada como pivô para um possível papel patogênico de Th17 em situações de infecção aguda, aumentando assim a agressão ao tecido cardíaco, e também com o recrutamento preventivo de

neutrófilos para o local infectado, o qual seria benéfico, porém, quando em excesso, se tornaria deletério à saúde, como mostrado em estudos anteriores. (Bi, *et al.*, 2007; Sanoja, *et al.*, 2013), participando assim, esta célula, ativamente da patogenia da doença de Chagas, contribuindo para a evolução e cronicidade da mesma.

Através do ecocardiograma foi feita a avaliação da função cardíaca através do cálculo da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), pois o mesmo é o método mais difundido para se avaliar diretamente função cardíaca (Magalhães, *et al.*, 2013), e notou-se que os pacientes chagásicos com menores valores de FEVE (< 50%), ou seja, cardiomiopatia estabelecida possuíram maiores quantidades de IL6, que o grupo controle, como também, que o grupo de pacientes chagásicos com FEVE > 50% (cardiomiopatia leve ou ausente), e esta citocina está envolvida na atuação de Th17, então pode-se inferir que estas células estão intimamente relacionadas à progressão da doença de Chagas, apesar de não ter sido encontrada uma relação direta e significativa entre a FEVE < 50% e a concentração de IL17, por estas células, principalmente, produzida. Ao contrário, foi observado neste estudo concentração maior de IL17 nos pacientes chagásicos com melhor função cardíaca (FEVE > 50%), o que pode evidenciar um papel protetor desta citocina isoladamente.

Em estudo anterior foi observado que, em cultura de esplenócitos infectada com o *T. cruzi*, a percentagem de células produtoras de IL-17 foi maior do que nos controles (que não continha *T. cruzi*), indicando que a cultura de parasitas aumentou o grau de produção de IL-17. Adicionalmente, houve uma redução significativa no parasitismo cardíaco de camundongos infectados

tratados com anticorpo anti-IL-17 em comparação com os tratados com anticorpo (IgG) controle, assim como a inibição da IL-17 resultou em um aumento de células inflamatórias no tecido cardíaco (Guedes, *et al.*, 2010), mesmo sendo estes dados de modelo de infecção celular aguda, corroboram os resultados que apontam para um duplo papel da mesma no presente estudo. Sendo assim, a IL-17 desempenha um papel crucial na resistência à infecção, modulando a reação inflamatória, até mesmo de forma protetora, correlacionada a uma melhor função cardíaca, como mostrado em estudos prévios (Sousa, *et al.*, 2017) e influenciando indiretamente a diferenciação de células T, através do meio de citocinas, porém o papel da IL-17 na patogênese de Chagas, quando associada à IL6, esta envolvida na destruição do miocárdio pela intensificação da resposta imune, com recrutamento excessivo de neutrófilos por exemplo, e a falta da regulação da mesma, pelas Tregs, como anteriormente neste estudo citado. Já outro estudo anterior a este mostra que níveis mais baixos de IL-17 no soro ajudaram a melhorar a função cardíaca em pacientes com insuficiência cardíaca (Wuyts, *et al.*, 2005), ou seja, realmente a IL17 possui um duplo papel, servindo como um imunomodulador. E isto pode determinar a progressão e o tratamento da doença de Chagas.

Assim como as alterações arrítmicas, pois é sabido que o receptor $\beta 1$ é ativado alostericamente ao reagir com os auto anticorpos, produzindo desta forma seu efeito primordial de aumentar a frequência cardíaca, no entanto, inadequadamente, podendo haver a dessensibilização ou inativação temporária, por internalização, deste receptor por excesso de ativação, ou ativação de forma prolongada, sem contudo ter sua *down* regulação proporcional, assim como o receptor M2, que também irá se ativar ao reagir com auto anticorpos, produzindo seu efeito, contrário ao anterior, diminuindo a

frequência cardíaca. Já que estes receptores ativam de formas diferentes os canais iônicos, como o de cálcio, modificando a permeabilidade da membrana plasmática celular, gerando alterações na contratilidade do miocárdio, levando assim, a arritmias, as quais podem evoluir para insuficiência cardíaca e causar até mesmo morte súbita dos pacientes (Acquatela, 1998).

Ademais, por ELISA, os pacientes chagásicos apresentaram maior tendência positiva, cerca de 58,82%, em auto reagir contra os receptores próprios do tecido cardíaco adrenérgico $\beta 1$ e acetilcolinérgico M2, o que evidencia a participação de componente autoimune na fisiopatogenia da doença de Chagas, mesmo que nem todos apresentaram os autoanticorpos contra estes receptores. Pois além desta presença de anticorpos contra epítomos próprios, outro estudo demonstra a existência de células T auto-reativas em pacientes chagásicos (Benoist & Mathis 2001). E em outro estudo foi demonstrado que a presença de anticorpos contra M2AChR, em ratos imunizados, foi capaz de gerar um aumento no tamanho do coração e uma mudança no seu formato de uma forma elipsoidal para uma forma mais arredondada, ou seja, induzir a cardiomiopatia dilatada, assim como aumentou os níveis de IL17 no tecido cardíaco (Martinez, *et al.*, 2015). E sabe-se que a concentração de IL17, maior em chagásicos, induz a expressão de várias quimiocinas pró-inflamatórias e de outras citocinas através da ativação de diversas cascatas de sinalização de receptores e que a mesma está ligada a processos autoimunes (Garg, *et al.*, 2013; Duerr, *et al.*, 2006).

Porém, através da análise deste estudo, não foi observado associação significativa entre os níveis de interleucinas plasmáticos e a presença ou não de autoanticorpos, e igualmente à relação destes com a FEVE, o que traz à

tona a discussão sobre os motivos deste resultado: primeiro, o n final do estudo foi menor que o inicial, devido à dificuldade em se obter mais amostras e exames distintos do mesmo paciente, visto que são em maioria, idosos e tem dificuldades diversas em realizar o acompanhamento clínico e experimental adequado, devido a dificuldades socioeconômicas ou a outras comorbidades comuns neste grupo em questão; Segundo, estes dados resultam de experimentos a níveis plasmáticos, ou seja, no sangue periférico visto que não foi realizado um ensaio de proliferação celular, será que os resultados diferem em níveis intracelular ou tecidual? Terceiro, para se determinar o cunho autoimune da doença de Chagas se faz necessária a co-estimulação através de outras proteínas cardíacas que seriam também semelhantes ao peptídeo de *T. cruzi* e por reação cruzada reagiriam a autoanticorpos, considerando-se também os distintos polimorfismos genéticos, principalmente em uma nação miscigenada como o Brasil, assim como as diferenças tanto genéticas, quanto endocrinológicas ligadas ao sexo (gênero), demonstrando assim que a doença de Chagas pode ser influenciada por mecanismos desregulatórios diversos.

Em concordância, Altschüller, em 2007, demonstrou que há a relação de interdependência entre a disfunção do nódulo sinusal e a presença de anticorpos contra M2, e que esta relação foi independente da presença de disfunção ventricular (FEVE < 50%), corroborando o presente estudo (Altschüller, *et al.*, 2007). Em suma, a doença de Chagas é influenciada por inúmeros fatores como as citocinas que são a chave de regulação do sistema imunológico, assim como, as reações cruzadas diversas, que geram autoimunidade, o que ainda não está totalmente esclarecido, sendo necessária análises futuras com um maior n, para se avaliar a proliferação celular em resposta a antígenos específicos de *T. cruzi* e também a autoantígenos.

6 – Conclusão

Portanto, conclui-se, que as células do sistema imune participam ativamente da patogenia da doença de Chagas através da maior produção de IL-17, nos chagásicos, assim como a maior concentração de IL6, e esta associação se mostrou crucialmente danosa ao tecido cardíaco, através da exacerbação da resposta imune, pois a produção de IL6 também é maior nos pacientes chagásicos com disfunção cardíaca, ou seja, FEVE < 50%.

Foram identificados autoanticorpos contra peptídeos próprios do tecido cardíaco, receptores β 1 e M2, em grande parte dos pacientes sem, contudo, estar associado aos níveis das citocinas avaliadas ou a disfunção cardíaca. Assim, mecanismos distintos contribuem para a evolução e cronicidade da doença de Chagas, que têm como “influenciadores – chave” as citocinas, e dentre estes também se encontram os mecanismos de autoimunidade, através de autoanticorpos.

7 - Perspectivas Futuras

Ampliar os estudos sobre a cardiomiopatia chagásica crônica, aumentando o a coleta de dados, para uma melhor análise dos resultados. Adicionalmente abordar outros aspectos da resposta imune através da avaliação da resposta celular frente a antígenos específicos do parasita e da produção de citocinas nestes cenários. Identificar o perfil celular envolvido na maior produção e conseqüente concentração plasmática de citocinas IL6 e IL17 nos chagásicos, apontando possíveis novos caminhos de elucidação sobre fisiopatogenia e progressão da doença gerando melhorias no tratamento e, assim, na vida dos pacientes.

8 – Referências

- ABBAS A.K., LICHTMAN A.H., PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. São Paulo: Elsevier; 2015.
- ACQUATELLA H. Avances recientes en miocardiopatía chagásica. *Revista Española de Cardiología*; v.51, p.152-157,1998.
- ACQUATELLA H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation*. v.115, n.9, p.1124-31, 2007.
- ALBAREDA M.C., LAUCELLA S.A., ALVAREZ M.G., *et al.* *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*. v.18, p. 465–471, 2006.
- ALMEIDA M.S., LORENA V.M.B., MEDEIROS C. DE A., OLIVEIRA JUNIOR W., CAVALCANTI M. DA G. A. M., MARTINS S. M., DE MORAIS C. N.L. Alternative Th17 and CD4+CD25+FoxP3+ cells frequency increase and correlate with worse cardiac function in Chagas cardiomyopathy. doi:10.1111/sji.12650, 2018.
- ALTSCHÜLLER M.B.C. DE M., PEDROSA R.C., PEREIRA B. DE B., FILHO W. B.C., DE MEDEIROS A.S., COSTA P.C.S. E DE CARVALHO A.C.C. Chronic Chagas disease patients with sinus node dysfunction: is the presence of IgG antibodies with muscarinic agonist action independent of left ventricular dysfunction? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.40, n.6, p. 665-671, 2007.

ANDRADE D.V., GOLLOB K.J., DUTRA W.O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. PLoS Negl Trop Dis v.8, n.7, e3010. doi:10.1371/journal.pntd.0003010, 2014.

ANEZ N., CARRASCO H., PARADA, *et al.*, Myocardial parasite persistence in chronic chagasic, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v.60, n.5, p.726-32,1999.

ARAUJO F.F., GOMES J.A.S.; ROCHA M.O.C, *et al.*, "Potential role of CD4+CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease," Frontiers in Bioscience. v. 12, n. 8, p. 2797–2806, 2007.

BENOIST C. & MATHIS D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? Nature Immunology. v.2, p.797-801, 2001.

BERMEJO D.A., JACKSON S.W., GOROSITO-SERRAN M., COSTA-RODRIGUEZ E.V.A., AMEZCUA-VESELY M.C., SATHER B.D., SINGH A.K., KHIM S., MUCCI J., LIGGITT D., CAMPETELLA O., OUKKA M., GRUPPI A. & RAWLINGS D.J. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR γ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. Nature Immunology. v. 14; n. 5, p.514-524, doi:10.1038/ni.2569, 2013.

BERS D.M. **Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force.** 2. ed. Editor: Kluwer Academic Pub; 2001.

BI Y., LIU G., AND YANG R. Th17 Cell Induction and Immune regulatory effects, Journal of Cell Physiology. v.211, p. 273–278, 2007;.

- BRENNER Z., WENDEL, S., CAMARGO, M.E., ROSSI, A. Immune response and immunopathology in *Trypanosoma cruzi* infection. in **Chagas' disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine.** ed São Paulo, Brasil ISTB. p13-19,1992.
- CABRAL-PICCIN M.P., GUILLERMO L.V.C., VELLOZO N.S., FILARDY A.A., PEREIRA-MARQUES S.T., RIGONI T.S., PEREIRA-MANFRO W.F., DOSREIS G.A. AND LOPES M.F. Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. Cell Death and Disease. v.7, n.2232, doi:10.1038/cddis.2016.135, 2016;.
- CARVALHO W.A., CARVALHO R.D.S., MEDRADO V.C., VIANNA P.T.G. Biologia Molecular dos Receptores Farmacológicos e seus Sistemas Efetores de Interesse em Anestesiologia. Ver. Bras. Anestesiol. v.47, n.2, p.152-157,1997.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Neglected Parasitic Infections in the United States Chagas Disease, 2013.
- CHIALE P.A., FEIGELSON E.A., LEVIN M., ELIZARI M.V., HOEKEBE J., ROSENBAUM M.B. Anticuerpos antireceptores B-adrenérgicos em La enfermedad de Chagas crônica. Revista Argentina de Cardiologia. v.62, n.1, 1994;.
- COSTA P.C.S. Desempenho Cardíaco na Cardiopatia Chagásica Crônica: Modulação das funções mecânica e elétrica cardíacas por autoanticorpos contra receptores acoplados a proteína G. Rio de Janeiro; 2006. Tese [Doutorado] – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ciências Biológicas, 2006.

CUNHA, D.M. O estudo dos autoanticorpos antirreceptores β 1 e anti-M2 na cardiopatia chagásica crônica. Rio de Janeiro; 2012. Tese [Doutorado] – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, 2012.

CUNHA-NETO E. COELHO V., GUILHERME L., FIORELLI A., STOLF N., KALIL J. Autoimmunity in Chagas' Disease. The American Society for Clinical Investigation, Inc. 0021-9738/96/10/1709/04. v. 098; n. 8, p.1709-1712, 1996.

DE ANDRADE J. P. *et al.*, Arq. Bras. Cardiol. v.96, n.6, p.434-442, 2011.

DE ARAUJO F.F., CORREA-OLIVEIRA R., ROCHA M. O. C., *et al.*, "Foxp3+CD25 highCD4+ 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. 768–777, 2012.

DIAS J.C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.22, n.3, p.147-56, 1989.

DIAS J.C.P., RAMOS JR. A.N., ALVES R.V., *et al.* in II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiologia Serviços de Saúde. v.25, n. Esp, Brasília, 2016.

DUERR R.H., TAYLOR K.D., BRANT S.R., RIOUX J.D., SILVERBERG M.S., DALY M.J., *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science. v.314, n.5804, p.1461. doi: 10.1126/science.1135245 PMID: 17068223, 2006;.

DUTRA W.O., MENEZES C., VILLANI F., *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; v.104, p.208–18, 2009.

DUTRA W.O. & GOLLOB K.J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. v.21, n.3, p.287-92, 2008.

DUTRA W.O., ROCHA M.O.C., TEIXEIRA M.M. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology*. v.21, n.12, p.581-587, 2005.

DUTRA W.O., COLLEY D.G., PINTO-DIAS J.C., GAZZINELLI G., BRENER Z., PEREIRA M.E., COFFMAN R.L., CORREA-OLIVEIRA R., CARVALHO-PARRA J.F. Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5C B cells or activated T cells chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol*. v.51, p. 91-97, 2000.

ELIES R., FERRARI I., WALLUKAT G., *et al.* Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies en patients with Chagas´ disease. *Journal of Immunology*. v.157, p.4203-11, 1996.

EDWARDS S.C., MCGINLEY A.M., MCGUINNESS N.C. AND MILLS K.H.G. $\gamma\delta$ T cells and NK cells – distinct pathogenic roles as innate-like immune cells in CNS autoimmunity. *Front. Immunol*. v.6, p.455. doi: 10.3389/fimmu.2015.00455, 2015.

- FERRARI I., LEVIN M.J., WALLUKAT G., *et al.* Molecular Mimicry between the immunodominant Ribosomal Protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional Epitope on the Human β 1- adrenergic. Receptor. Journal of Experimental Medicine. v.182, p.59-65, 1995.
- FUENMAYOR C., HIGUCHI M.L., CARRASCO H., PARADA H., GUTIERREZ P., AIELLO V., PALOMINO S. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T cruzi* parasitic antigens. Acta Cardiologica. v.60, n.1, p.33-7, 2005.
- GAFFEN S. IL-17 receptor composition. Nat Rev Immunol. v.16, n.1, p.4, 2016.
- GARG A.V., AHMED M., VALLEJO A.N., MA A., GAFFEN S.L. The deubiquitinase A20 mediates feedback inhibition of interleukin-17 receptor signaling. Sci Signal. v.6, n.278, p.44. doi: 10.1126/scisignal.2003699 PMID: 23737552, 2013.
- GIRONES N. E FRESNO M., Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence or both. Trends in Parasitology. v.19, n.1, p.19-22, 2003;.
- GONZÁLEZ-TOMÉ M.I., LÓPEZ-HORTELANO M.G., FREGONESE L. Luces y sombras en la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas. An Pediatr (Barc). v.1, doi:10.1016/2018.01.005, 2018.
- GRAEBER K.E., OLSEN N.J. Th17 cell cytokine secretion profile in host defense and autoimmunity. Inflamm Res. v.61, p.8796. doi:10.1007/s00011-011-0419-1, 2012;.

- GUATIMOSIM S., DILLY K., SANTANA L.F., JAFRI M.S., SOBIE E.A., LEDERER W.J. Local Ca(2+) signaling and EC coupling in Ca(2+) sparks and the regulation of the [Ca(2+)](i) transit. *J. Mol. Cell. Cardiol.* V.34, n.8, p.941-50. Review, 2002.
- GUEDES P.M. DA M, GUTIERREZ F.R.S., MAIA F.L., MILANEZI C.M., SILVA G.K., PAVANELLI W.R., SILVA J.S. IL-17 Produced during Trypanosoma cruzi Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. *Plos One*; v.4,n.2, p.1-11, e604, 2010.
- GUEDES P.M.M., GUTIERREZ F.R.S., SILVA, *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 Dis*, v.6, n.4, p.1630-40, 2012;.
- HEINRICH P.C., CASTELL J.V., ANDUS T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* v.265, n.3, p.621-636, 1990.
- IWAKURA Y., ISHIGAME H., SAIJO S., NAKAE S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* v.34, n.2, p.149–62, doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.012 PMID: 21349428, 2011.
- KOLIAS T.J., AARONSON K.D., ARMSTRONG W.F. Doppler-derived dP/dt predict survival in congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* v.36, p.1594-9, 2000.
- KRIEGER J.E. **Bases moleculares das Doenças cardiovasculares: a interação entre a pesquisa e a prática clínica** / Editor J.E. Krieger, São Paulo: Atheneu, ISBN 978-85-7379-979-8, 2008.

- LEE B.Y., BACON K. M., BOTTAZZI M. E., HOTEZ P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis*; v.13, p.342–48. Doi:10.1016/S1473-3099(13)70002-1, 2013.
- LE SAUX S., WEYAND C.M., GORONZY J.J. Mechanisms of immunosenescence: lessons from models of accelerated immune aging. *Ann NY Acad Sci*; v.1247, p.69-82, 2012.
- LENT R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais da neurociência.** 2 ed. São Paulo: Atheneu, p. 13-145, 2010.
- LESCURE F.X., LE LOUP G., FREILIJ H., DEVELOUX M., PARIS L., BRUTUS L., *et al.* Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis*; v.10, p.556–570, 2010.
- LEVIN, M.J., MESRI, E BENAROUS, R., *et al.* Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic chagas' heart disease. *American Journal of Tropical Medicine*; v.41, n.5, p.530-8, 1989.
- LEVIN, M.J. Molecular mimicry and Chagas' heart disease: high anti-R13 autoantibody levels are markers of severe heart complaint. *Research in Immunology*; v.142, n.2, p.157-9, 1991.
- LI X.F., PAN D., ZHANG W.L., ZHOU J. AND LIANG J.J. Association of NT-pro BNP and interleukin-17 levels with heart failure in elderly patients. *Genet. Mol.; Res.* v.15, n.2, gmr.15028014, 2015.
- LI M.O. & FLAVELL R.A. Contextual Regulation of Inflammation: A Duet by Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10. *Immunity*. Elsevier Inc.; v.28, n.468, p.476, 2008.

- MAGALHÃES L. M. D., VILLANI F. N. A., NUNES M. DO C. P., GOLLOB K. J., ROCHA M. O. C., AND DUTRA W. O. High Interleukin 17 Expression Is Correlated With Better Cardiac Function in Human Chagas Disease. *The Journal of Infectious Diseases*; v.207 p.661–5, 2013.
- MARCONDES, J. & RASSI, A. A doença de Chagas. *Protozooses Humanas*, ed. Fundo Editorial, 1994.
- MARIN-NETO J.A., CUNHA-NETO E., MACIEL B.C., SIMÕES M.V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. v.115, n.9, p.1109-23, 2007.
- MARINO A.P.M. P., DA SILVA A., DOS SANTOS P. *et al.*, “Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis,” *Circulation*; v.110, n.11, p.1443–1449, 2004.
- MARTINEZ C.G., ZAMITH-MIRANDA D., DA SILVA M.G., RIBEIRO K.C., BRANDÃO I.T., SILVA C.L., DIAZ B.L., BELLIO M., PERSECHINI P.M. & KURTENBACH E. P2x7 purinergic signaling in dilated cardiomyopathy induced by auto-immunity against muscarinic M2 receptors: autoantibody levels, heart functionality and cytokine expression. *Scientific Reports*. v.5, p.16940, DOI: 10.1038/srep16940, 2015.
- MASUDA M.O., LEVIN M., FARIAS DE OLIVEIRA S.F., *et al.* Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB Journal*, v.12, p.1551-8, 1998.

MATOS M.N., CAZORLA S.I., SCHULZE K., EBENSEN T., GUZMÁN C.A., MALCHIODI E.L. Immunization with Tc52 or its amino terminal domain adjuvanted with c-di-AMP induces Th17+Th1 specific immune responses and confers protection against *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop, 2017; Dis v.11, n.2, e0005300. doi:10.1371/journal.pntd.0005300, 2017.

MICHAILOWSKY V., SILVA, N. M., ROCHA, C. D., VIEIRA, L. Q., LANNES-VIEIRA, J. AND GAZZINELLI, R. T. "Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection," The American Journal of Pathology; v.159, n.5, p.1723–1733, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. In Consenso Brasileiro em doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v.38, n.3, p.7-29, 2005.

MIYAZAKI Y., HAMANO S., WANG S., SHIMANOE Y., IWAKURA Y., YOSHIDA H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol; v.185, p.1150–7, 2010.

MONCAYO A., YANINE M.I.O. Centennial review. An update on Chagas disease (human american trypanosomiasis). Annals of Medical Medicine and Parasitology. v.100, n.8, p.663-677, 2006.

MORILLO C.A., MARIN-NETO J.A., AVEZUM A., SOSA-ESTANI S., RASSI A. JR., ROSAS F., *et al.* Randomized Trial of benznidazole for chronic chagas' cardiomyopathy. N Engl J Med; v.373, p.1295–1306, 2015.

MURANSKI P. & RESTIFO N.P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *The American Society of Hematology, Blood*. v.121, n.13, p.2402-2414, 2013.

NICKELL S.P., STRYKER G.A., AREVALO C. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J Immunol*; v.150, p.1446–1457, 1993.

NOGUEIRA L. G, SANTOS R. H. B., FIORELLI A. I., CONTIMAIRENA E., BENVENUTI L. A., BOCCHI E. A., STOLF N. A., KALIL J., AND CUNHA-NETO E. “Myocardial Gene Expression of T-bet, GATA-3, ROR- γ t, FoxP3, and Hallmark Cytokines in Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: An Essentially Unopposed TH1-Type Response”, *Hindawi Publishing Corporation- Mediators of Inflammation*, v.2014, Article ID 914326, p.9, 2014.

OLSEN N.J. & KOVACS W.J. Gonadal steroids and immunity. *Endocr. Rev.* v.17, p.369–84, 1996.

PARADA H., CARRASCO A., AÑEZ N., FUENMAYOR C., INGLESSIS I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *International Journal of Cardiology*; v.60, p.49-54,1997.

PARISI A.F., MOYNIHAN P.F., FELDMAN C.L., FOLLAND E.D. Approaches to determination of left ventricular volume and ejection fraction by real-time two-dimensional Echocardiography. *Clin Cardiol*. v.2, p.257-63, 1979;.

RASSI A., AMATO NETO V., RASSI G.G., AMATO V.S., RASSI JUNIOR A., LUQUETTI A.O., RASSI S.G. A retrospective search for maternal

transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; v.37, n.6, p.485-9, 2004.

RASSI A., TRANCHESI J., AND TRANCHESI B. **Doença de Chagas**. In *Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 7. ed. R. Veronesi, editor. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brazil. p.675–712, 1982.

REIS D.D., JONES E.M., TOSTES S., *et al.* Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; v.49, p.192–200, 1993.

REIS, D. D. *et al.*, Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF-alfa+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.43, p.637-642, 1993.

RIBEIRO, A.L.P. & ROCHA M.O.C. Forma indeterminada da doença de Chagas. in: ***Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas***. Em: Brenner, Z, Andrade, ZA, e Barral-Neto, M. 2. ed. Editora Guanabara Koogan. p246-265, 2000.

SAÉZ-ALQUÉZAR A., LUQUETTI A.O., PEREIRA J.B., MOREIRA E.F., GADELHA M.F.S., GARCIA-ZAPATA M.T., *et al.* Estudo multicêntrico: avaliação do desempenho de conjuntos diagnósticos de hemaglutinação indireta, disponíveis no Brasil, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Patol Trop.*; v.26, n.2, p.343-74, 1997.

- SANOJA, C., CARBAJOSA S., FRESNO M., *et al.* Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection PLoS One. v.11, n.8, p.6, e65820, 2013.
- SATO K. Helper T Cell Diversity and Plasticity – Possible Role in Cardiovascular Disease., *Circulation Journal Official., Journal of the Japanese Circulation Society.* v.78, doi: 10.1253/circj.CJ-14-1164, 2014.
- SAXENA A., DOBACZEWSKI M., RAI V., HAQUE Z., CHEN W., LI N., AND FRANGOIANNIS N. G., Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiology.* v.307, p.1233–1242, 2014.
- SILVERIO J.C., PEREIRA I.R., CIPITELLI MDA C., VINAGRE N.F., RODRIGUES M.M., GAZZINELLI R.T., *et al.* CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog*, v.8, e1002645, 2012;.
- SOUSA G.R, GOMES JAS, DAMASIO M.P.S, NUNES M.C.P, COSTA H.S, MEDEIROS N.I, *et al.* The role of interleukin 17-mediated immune response in Chagas disease: High level is correlated with better left ventricular function. *PLOS ONE.* v.12, n.3, e0172833. doi:10.1371/journal.pone.0172833, 2017.
- SOUSA, G.R. DE. Citocinas plasmáticas como biomarcadores de morbidade cardíaca na Doença de Chagas [manuscrito]. / Giovane Rodrigo de Sousa. - Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. Belo Horizonte:107f.: il, 2012.

- TANOWITZ H.B., MACHADO F.S., JELICKS L.A., SHIRANI J., CARVALHO A.C.C., SPRAY D.C., *et al.* Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.* V.51, n.6, p.524-39, 2009;.
- TEIXEIRA A.R.L. & SANTOS-BUCH C.A. The immunology of Experimental Chagas' disease. *Immunology.* v.28, p.401-410, 1975.
- TEIXEIRA A., CUNHA-NETO E., RIZZO L.V., AND SILVA R. Trypanocidal Nitroarene treatment of experimental *Trypanosoma cruzi* infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbit. *J. Infect. Dis.* V.162, p.1420, 1990;.
- TIBBETTS, R.S., MCCORMICK, T.S., ROWLAND, E.C., MILLER, S.D., AND ENGMAN, D.M. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Immunol.* v.152, p.1493-1499, 1994.
- TRUYENS, C., ANGELO-BARRIOS, A., TORRICO, F., VAN DAMME, J., HEREMANS, H. & CARLIERL, Y. Interleukin-6 (IL-6) Production in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*: Effect of Its Paradoxical Increase by Anti-IL-6 Monoclonal Antibody Treatment on Infection and Acute-Phase and Humoral Immune Responses. *Infection And Immunity*, v.62, n.2, p.692-696, 1994,
- VILLANI F.N., ROCHA M.O., NUNES M.DO C., *et al.* *Trypanosoma cruzi* -induced activation of functionally distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD4- CD8- T cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. *Infect Immun.* v.78, p.4421-30, 2010.

- WANG T., SUN X., ZHAO J., ZHANG J., ZHU H., LI C., *et al.* Regulatory T cells in rheumatoid arthritis showed increased plasticity toward Th17 but retained suppressive function in peripheral blood. *Ann Rheum Dis*; v.74, p.1293–301. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204228, 2015.
- WHIBLEY N., MACCALLUM D.M., VICKERS M.A., ZAFREEN S., WALDMANN H., HORI S., *et al.* Expansion of Foxp3+T-cell populations by *Candida albicans* enhances both Th17-cell responses and fungal dissemination after intravenous challenge. *Eur J Immunol.* v.44, p.1069–83, doi:10.1002/eji.201343604, 2014.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N° 340. Updated March 2015. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2015.
- WUYTS W.A., VANAUDENAERDE B.M., DUPONT L.J., VAN RAEMDONCK D.E., *et al.* Interleukin-17--induced interleukin-8 release in human airway smooth muscle cells: role for mitogen-activated kinases and nuclear factor-kappaB. *J. Heart, Lung Transplant.* V.24, p.875-881. doi:10.1016/j.healun.2004.05.003, 2005;.
- ZHOU L., CHONG M.M.W., LITTMAN D.R. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*; v.30, p.646–55. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.001, 2009.
- ZHU Z.F. , LI J.J., LIU J., TANG T.T., DING Y.J., LIAO Y.H., CHENG X., WANG X. Circulating Th17 cells are not elevated in patients with chronic heart failure. *Scand Cardiovasc J.* v.46, n.5, p.295-300. doi: 10.3109/14017431.2012.699096, 2012.