



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Mariana Miziara de Abreu Teodoro

**Análise do padrão de resposta Th17 e de células T
regulatórias em pacientes com a forma digestiva da doença
de Chagas crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Aparecida Calvi

Coorientadora: Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Coorientadora: Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu

2016

Mariana Miziara de Abreu Teodoro

Análise do padrão de resposta Th17 e de células T regulatórias em pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas crônica

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Aparecida Calvi

Coorientadora: Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Coorientadora: Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Teodoro, Mariana Miziara de Abreu.

Análise do padrão de resposta Th17 e de células T regulatórias em pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas crônica / Mariana Miziara de Abreu Teodoro. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Sueli Aparecida Calvi
Coorientador: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
Coorientador: Lucilene Delazari dos Santos
Capes: 40101096

1. Células T. 2. Chagas, Doença de. 3. Megaesôfago. 4. Megacólon. 5. Resposta imune.

Palavras-chave: Células Th17; Células Treg; Doença de Chagas; Megacólon; Megaesôfago.

Estudo realizado no laboratório do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Este projeto contou com bolsa FAPESP processo nº 2013/02223-7 e com auxílio à pesquisa FAPESP processo nº 2014/04019-0.

Epígrafe

“Mesmo que a vida pareça ruim, há sempre algo que se pode fazer e obter sucesso.

**”
Enquanto há esperança, há vida!**

(Stephen Hawking)

Dedicat3ria

Dedico este estudo à minha querida orientadora Sueli.

**Obrigada pela oportunidade, incentivo, apoio,
dedicação, carinho, amizade e amor.**

Sem você eu não teria chegado até aqui.

Você é o meu exemplo.

Agradecimientos

“Nenhum dever é mais importante que a gratidão.”

(Cícero)

Agradeço à Deus, por toda força, paciência e aprendizado.

*Obrigada por me guiar e confortar com suas palavras e ensinamentos,
mas principalmente, por não me deixar perder o equilíbrio nos
momentos difíceis.*

Meus agradecimentos especiais à minha família:

*Agradeço aos meus pais, Oswaldo e Ana, por tudo que me ensinaram e
por me ajudarem a chegar até aqui; se hoje sou a pessoa que sou, é
graças à todos os ensinamentos de vocês!*

Vocês são meu orgulho, meu exemplo e minha vida!

Amo vocês de todo meu coração!

*Obrigada ao meu querido irmão, Bruno, por todo amor, por todas as
risadas, pelo apoio e incentivo que sempre me deu. Obrigada por ser
tão especial!*

*Agradeço também a minha querida irmã e melhor amiga, Juliana, pela
amizade, carinho, compreensão, paciência, apoio e por todos os “Tenha*

força”, “Calma que vai dar tudo certo” e “Você consegue”. Obrigada por estar comigo nos melhores e piores momentos da minha vida.

Vocês são tudo pra mim! Amo vocês!

Agradeço ao meu querido marido, companheiro e eterno namorado, Leonardo, por toda paciência, apoio incondicional, confiança, suporte, carinho e amor.

Você me faz ser uma pessoa melhor todos os dias!

Obrigada por estar sempre ao meu lado e me fazer enxergar o mundo de uma forma melhor e mais bonita!

Amo você!

Obrigada a meus sogros e sogras, cunhados e cunhadas por todo apoio sempre!

Agradeço também aos meus entes queridos que estão ou não mais presentes em minha vida, vocês contribuíram muito para que eu chegasse até aqui, muito obrigada!

À minha querida orientadora Profa. Dra Sueli Aparecida Calvi, por se tornar parte da minha família. Obrigada pela oportunidade, por todos os ensinamentos compartilhados, pela amizade, carinho, enfim, por tudo.

Os momentos que passei com você, carregarei para sempre! Obrigada por mudar a minha vida! Você sempre será meu exemplo!

Meus sinceros agradecimentos:

À minha querida amiga Mariana Gatto, por toda ajuda, dedicação, cumplicidade, carinho e amizade. Obrigada por compartilhar comigo todos os seus conhecimentos e por estar presente nos momentos bons e ruins que passamos. Você me ajudou em todas as partes deste trabalho sempre com a maior disposição. Te admiro muito e te levarei pra sempre em meu coração.

À minha querida amiga Jéssica “Radinha”, por todo interesse em aprender e por não medir esforços em me ajudar. Obrigada por todo companheirismo, carinho, atenção, amizade e principalmente, por fazer com que nossas longas noites de experimentos, não parecessem tão longas assim. Obrigada por ser meu braço direito. Eu não teria conseguido sem você!

À minha amiga e companheira de mestrado Laura, por toda ajuda, companheirismo e amizade. Nosso caminho durante o mestrado não foi fácil, mas sempre estávamos “acudindo” uma a outra. Obrigada por

todas as risadas em nossas tardes de segunda-feira. Te desejo muito sucesso!

Ao meu querido amigo Sebastião, pela amizade e pelas belas palavras de apoio nos momentos difíceis. Obrigada por sempre me ouvir, aconselhar e dividir comigo os momentos de tristeza e alegria. Embora não tenha participado ativamente deste trabalho, você me ajudou muito.

Obrigada por sempre me lembrar que “não sou obrigada”.

Ao colaborador deste trabalho, Dr. Rodrigo Mattos dos Santos, pela grande ajuda na realização dos experimentos. Obrigada por me acalmar nos momentos de desespero, tentando me ajudar a encontrar soluções para os problemas que apareceram ao longo do caminho.

Aos médicos Prof. Dr. Paulo Câmara Marques Pereira e a Dra. Érika Alessandra Pellison Nunes da Costa, por toda contribuição na triagem dos pacientes para a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu, Aline, Léia e Carol, muito obrigada pela ajuda. Em especial agradeço à Dra. Marjorie de Assis Golim, pelas análises e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas de laboratório Drika, Thaty e Vanessa, obrigada pelos bons momentos que vivemos juntas, por todos almoços e conversas. Esses momentos foram extremamente importantes para deixar mais leve nossas vidas.

À Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, por me acolher num momento tão difícil e me orientar com tanta excelência e paciência neste último ano.

À banca do Exame Geral de Qualificação, em especial à Profa. Dra. Lenice do Rosário de Souza e Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melício, pela cooperação e disposição em analisar esse trabalho. Obrigada pelas valiosas observações.

À todos os professores e funcionários do programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, da UNIPEX, da FMB-UNESP e do Hospital das Clínicas de Botucatu.

Aos meus queridos amigos de faculdade, Fernanda, Marina, Ana Laura, Rodrigo, Priscila e Sarah, por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Obrigada eterno Bloco A.

Aos amigos de Bauru, Botucatu e de toda uma vida, obrigada por sempre tentarem estar por perto, mesmo com a distância e com o pouco tempo disponível.

Aos amigos da comissão organizadora do “VIII Encontro da Pós-Graduação” pela companhia, conversas e trocas de experiências.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo e auxílio à pesquisa concedidos.

Aos doadores de sangue e principalmente aos pacientes, que voluntariamente e sem nenhum tipo de bonificação aceitaram participar deste estudo e dividiram comigo suas experiências de vida, me ensinando grandes lições.

E, finalmente, à todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado e não foram citados.

Muito obrigada!

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 1

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 8

CAPÍTULO 1 (artigo enviado para publicação) 13

CONCLUSÃO 33

ANEXOS 35

Resumo

A Doença de Chagas (DC), cujo agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), tornou-se nos últimos anos um grave problema de saúde pública, mesmo em países não-endêmicos. Um importante desafio para os pesquisadores da doença de Chagas é estabelecer os eventos que levam alguns pacientes a desenvolver a doença crônica assintomática, ou forma indeterminada, enquanto outros evoluem para uma doença severa, com lesões em tecidos cardíacos ou gastrointestinais. Alguns estudos têm sugerido que a ausência de sintomas clínicos em indivíduos com a forma crônica indeterminada está associada a um controle eficaz da resposta imune efetora contra o parasita, que evita uma resposta inflamatória excessiva, o que resultaria em lesão tecidual. Não existem estudos com o objetivo de confirmar este mecanismo em pacientes com a forma digestiva da DC, especialmente em relação ao controle modulador de mecanismos efetores envolvendo células Th17, por células Treg. No presente estudo, nós avaliamos em pacientes com a forma digestiva da DC e em pacientes com a forma indeterminada ou assintomática a taxa de ativação Th17/Treg, através da avaliação da frequência de células Th17 e Treg por citometria de fluxo; da expressão do mRNA para Ror γ t e Foxp3, fatores de transcrição envolvidos na diferenciação dessas células, respectivamente; bem como os níveis de IL-17a e IL-10 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC's). Foi demonstrado no presente estudo, que em pacientes com a forma digestiva da DC há um desequilíbrio na taxa de ativação de células Th17/Treg, favorecendo o perfil Th17, enquanto que em pacientes com a forma indeterminada, este desequilíbrio favorece

o perfil Treg. Os nossos resultados apoiam a hipótese de que o desequilíbrio na taxa de ativação Th17/Treg observado no grupo de pacientes digestivos, favorecendo Th17 em detrimento de Treg, geraria um ambiente não regulador, que resulta em uma resposta inflamatória exacerbada, responsável pelas lesões dos tecidos gastrointestinais apresentadas por estes pacientes.

Abstract

Chagas disease (CD) whose etiological agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) in recent years became a serious problem of public health even in nonendemic countries. One important challenge for the researchers of Chagas disease is to establish the events that lead some patients to develop asymptomatic or indeterminate chronic disease, while others undergo severe disease with lesions in cardiac or gastrointestinal tissues. Some studies have suggested that absence of clinical symptoms in individuals with the indeterminate chronic form is associated to a fine control of effector immune responses against the parasite that avoid a perpetuated inflammatory process which results in tissue injury. There are no studies aiming to confirm this mechanism in patients with digestive form of the disease, particularly in relation to the modulatory control by Treg cells of effector mechanisms involving Th17. Here, we studied in patients with the digestive form of CD and in those with the indeterminate or asymptomatic form of the disease, the ratio Th17/Treg activation by evaluating the frequency of Th17 and Tregs cells by flow cytometry, mRNA expression for Ror γ t and Foxp3, the transcription factors involved in the differentiation of these cells respectively as well as the levels of IL-17a and IL-10 in peripheral blood mononuclear cells culture supernatants. We showed that in patients with digestive form of the disease there is an

imbalance in the ratio Th17/Treg cells activation in favor of Th17, while in patients with the indeterminate form, this imbalance favour Treg activation. Our findings support the hypothesis that in contrast with indeterminate patients a non regulatory environment observed in patients with digestive CD, which results in an exacerbated inflammatory response exerted by Th17, due to lower Treg activation, may be responsible for tissue lesions in these patients.

Revisão

Bibliográfica

A doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanosomíase americana é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). É uma doença negligenciada e considerada um grave problema de saúde pública com sérias deficiências no tratamento e a falta de uma vacina eficaz, até o momento. É endêmica na América Latina, embora, nas últimas décadas sua detecção tenha aumentado nos EUA, Canadá e em vários países da Europa, devido, principalmente, a migração de latino-americanos. Atualmente, existem aproximadamente 10 milhões de pessoas infectadas no mundo todo e mais de 25 milhões vivendo em áreas de risco.¹

A principal forma de transmissão da DC é a transmissão vetorial, mas também pode ser transmitida por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e transmissão vertical (da mãe para o feto).² Mais recentemente, uma importante forma de transmissão foi evidenciada no Brasil, a via oral, através de alimentos contaminados com as fezes do inseto vetor.³

A DC evolui em duas fases, a aguda, que dura de 2 a 4 meses e é caracterizada pela alta parasitemia. Na maioria das vezes não apresenta sinais e sintomas específicos, o que dificulta sua detecção, porém se detectada e tratada a tempo pode ser curada; e a fase crônica caracterizada pela baixa parasitemia, e que persiste por toda a vida.⁴

Na fase crônica, os pacientes podem apresentar 4 diferentes formas clínicas: indeterminada, cardíaca, digestiva e mista; sendo que nesta última, temo manifestações cardíacas e digestivas ao mesmo tempo. A grande maioria dos pacientes que evoluem para a fase crônica permanece com sorologia positiva, porém assintomáticos, por muitos anos, caracterizando a forma indeterminada. Dos

pacientes com a forma indeterminada da DC, de 30 a 40% podem evoluir para forma sintomática, sendo que destes, aproximadamente, 10 % evoluem para a forma digestiva.⁵ Porém, não existe, até o momento, um marcador que determine se o indivíduo irá evoluir ou não para as formas clínicas da doença.

A cardiomiopatia chagásica é resultado de um intenso processo inflamatório com a presença de um grande número de células no miocárdio. Esta infiltração celular pode ser uma resposta para o tropismo cardíaco do parasita e ou falhas nos mecanismos de regulação do processo inflamatório. Esses mecanismos ainda não estão totalmente entendidos, mas, provavelmente, depende de fatores genéticos do hospedeiro, pois algumas pessoas, apesar da infecção, nunca desenvolvem doença cardíaca.⁶

As manifestações da forma digestiva da DC são atribuídas à destruição de nervos do plexo mioentérico, o que leva a movimentos peristálticos descoordenados, hipertrofia muscular e dilatação.⁷ O megaesôfago e o megacólon são as maiores causas de morbidade na forma clínica digestiva da DC crônica, sendo que para o desenvolvimento do megaesôfago é necessária uma redução de aproximadamente 85% do número de neurônios, e no megacólon, uma perda de pelo menos 50% do número de neurônios.⁸ Patologicamente, ambos os órgãos, esôfago e cólon, exibem um grande alargamento luminal e hipertrofia muscular. Microscopicamente, infiltrados inflamatórios e fibroses encontradas foram associadas com lesões de células musculares e do sistema nervoso intramural.^{8,9} Os infiltrados inflamatórios são compostos principalmente por linfócitos T CD3⁺CD4⁺, linfócitos B CD20⁺, células NK CD57⁺ e macrófagos CD68⁺.^{10,11} A persistência do kDNA do *T. cruzi* na lesão crônica sugere um papel do parasita na manutenção da ativação celular e do processo inflamatório tardio.¹²⁻¹⁴

A causa da destruição neural na DC tem sido debatida na literatura. Na fase aguda, quando o *T. cruzi* está presente em números elevados no tecido, o parasita pode ser responsável pelas lesões neurais. Em contraste, a carga parasitária é muito baixa nas lesões chagásicas durante a fase crônica. Além disso, a frequente ocorrência de ganglionite e periganglionite em pacientes desenvolvendo megaesôfago e/ou megacólon aponta para a participação das células do sistema imune nesse processo.¹⁵ Além disso, foi demonstrada, uma forte associação entre a taxa de deservação e a presença de células com potencial citotóxico.¹⁶ Apesar da importância desta forma da doença em áreas endêmicas, os mecanismos imunológicos envolvidos no dano tecidual não têm recebido atenção adequada nos últimos anos.¹⁷

Muitas das manifestações clínicas observadas na DC são consequências da resposta imune do hospedeiro contra o parasita.¹⁸ Em cada fase da infecção existe uma resposta específica, com repertório de células, citocinas e outras substâncias que reduzem a carga parasitária, auxiliando na defesa do organismo, mas que também estão envolvidas na patogenia da doença.

Assim, após a infecção, a imunidade celular tenta isolar o parasita a fim de evitar sua disseminação e a resposta humoral, simultânea, produz, inicialmente, anticorpos da classe IgM e, após 2 a 3 semanas, da classe IgG. No entanto, a ineficiência dos mecanismos imunes para eliminar o *T. cruzi* garante sua persistência no organismo e desencadeia resposta inflamatória, resultando em danos aos tecidos durante a fase crônica da doença.¹⁹

Linfócitos de pacientes chagásicos e animais infectados com *T. cruzi* são capazes de reconhecer epítomos próprios, sugerindo uma possível resposta

autoimune.²⁰ Alguns autores acreditam que persistência do parasita e autoimunidade coexistem na doença de Chagas e que estratégias de invasão do parasita e defeitos na homeostasia imune do hospedeiro são importantes para o desenvolvimento das formas clínicas da doença.²¹ Estudos demonstraram que uma forte resposta inflamatória pode ser encontrada em estágios avançados da doença, mesmo na ausência do parasita.²²⁻²⁴

O repertório de células do sistema imune, com alto nível de ativação, observado durante a fase aguda da infecção chagásica, compreende macrófagos, células NK, T CD4⁺ e T CD8⁺.²⁵⁻²⁸ O *T. cruzi* pode induzir a síntese de IL-12 e de outras citocinas por macrófagos e células dendríticas.²⁹⁻³¹ A resposta Th1 que se segue caracteriza-se pela produção de IFN- γ por linfócitos T, com consequente aumento na ativação das células fagocíticas para destruir parasitas internalizados, aumentando H₂O₂, o óxido nítrico e a produção de TNF- α .³²⁻³⁵ As células NK desempenham também um papel importante na resistência à infecção aguda, principalmente devido à sua produção precoce de IFN- γ .^{36,37} Animais tratados com anti-IFN- γ apresentam-se mais susceptíveis à infecção pelo parasita, enquanto aqueles que recebem IFN- γ tornam-se mais resistentes.³⁸⁻⁴⁰ Michailowsky *et al.*⁴¹ demonstraram ação sinérgica do IFN- γ com o tratamento antiparasitário na fase aguda da infecção. No entanto, esta citocina também tem sido relacionada ao desenvolvimento de cardiopatia na fase crônica da infecção, o que sugere que tenha um duplo papel na DC.⁴²

O TNF- α é outra citocina pró-inflamatória com papel destacado na modulação da resposta imune protetora na infecção pelo *T. cruzi*.^{43,44} Essa substância controla o crescimento dos parasitas pela ativação das células fagocitárias.⁴⁵

Assim como a IL-12 participa da diferenciação em resposta Th1, a IL-4 promove a resposta Th2, indutora de imunidade humoral, na ausência de IL-12 e IFN- γ .⁴⁶ Além disso, o aumento de secreção de IL-10, durante a fase crônica, pode estar associado à proteção do hospedeiro contra resposta inflamatória intensa, induzida pelo perfil Th1. Essa citocina, também do perfil Th2, é produzida pelos macrófagos e regula a expressão ou função de IL-12 e IFN- γ .^{47,48} Dutra *et al.*⁴⁹ detectaram níveis mais altos de IL-5, IL-10, IL-13, e IFN- γ em pacientes chagásicos crônicos em relação a indivíduos não infectados, sugerindo que o equilíbrio entre essas citocinas pode ser o ponto principal do controle da morbidade, durante a fase crônica da infecção.

A resistência de um organismo às infecções requer a geração de uma resposta imune que, não só, controle o patógeno invasor, mas, também, que limite os danos colaterais aos tecidos do próprio hospedeiro, resultantes dessa resposta.⁵⁰ Assim, ao mesmo tempo em que os elementos efetores agem no sentido de eliminar o parasita, mecanismos reguladores são ativados, minimizando a lesão tecidual provocada pela própria resposta imune.^{50,51} As células T usam diferentes mecanismos para regular a resposta imune durante a doença de Chagas, e as interações parasita-hospedeiro podem ser influenciadas pela relação células T reguladoras/efetoras.⁵²

As células T regulatórias (Tregs) foram descritas como uma população de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, em que sua principal característica é o fator de transcrição Forkhead Box P3, (Foxp3) que regulam as respostas imunes inata e adaptativa.⁵² As Tregs modulam as respostas imunes, não só para antígenos próprios e tumorais, mas também a antígenos exógenos e agentes infecciosos.⁵³⁻⁶⁰ Elas têm a capacidade de suprimir a proliferação e produção de IFN- γ das células T

CD4⁺ e CD8⁺, regular negativamente a ativação e capacidade citolítica de células T CD8⁺, e modular as respostas imunes humorais.⁶¹⁻⁶³ Desta forma, as células Treg servem para limitar o dano tecidual, mas também podem impedir a eliminação da infecção por supressão de respostas imunes cruciais.⁶⁴

As Tregs através da expressão de IL-10 e TGF- β atuam beneficiando os pacientes com a forma indeterminada da DC, mantendo o equilíbrio entre células efetoras que matam os parasitas e evitando o desenvolvimento da imunopatologia tecidual.⁵²

Embora não haja evidência para a verdadeira função desta população de células na doença de Chagas, já foi demonstrado que, no sangue periférico de pacientes indeterminados há um aumento na frequência de circulação de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e esses pacientes também apresentam um aumento significativo na concentração de células Foxp3⁺ no tecido do coração, sugerindo que estas células podem estar envolvidas no controle da morbidade da doença de Chagas.⁶⁵⁻⁶⁷

Nos últimos anos, a explicação de resistência e suscetibilidade a infecções parasitárias baseada na dicotomia Th1 e Th2 e na atuação das células Tregs têm sofrido uma análise mais cuidadosa, a partir de estudos mostrando que durante o processo de diferenciação para células efetoras as células CD4⁺ podem seguir destinos alternativos que não envolvem Th1, Th2 ou Treg. Nesse sentido, as células CD4⁺ cultivadas na presença de TGF- β , IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-21 passam a expressar o fator de transcrição ROR γ t (“retinoid-related orphan receptor gamma”) e transformam-se na subpopulação Th17 que desempenha um papel atribuído inicialmente a uma hiperativação de células Th1.⁶⁸ Essas células, que produzem IL-

17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e TNF- α , promovem um processo inflamatório intenso mediado por neutrófilos e estão associadas a doenças autoimunes e à resistência contra várias infecções bacterianas e parasíticas, mas também podem correlacionar-se com imunopatologia em diversas outras infecções.⁶⁹ Dentre as citocinas já citadas, importantes para a diferenciação de Th17⁶⁸, destacamos a IL-23, produzida principalmente por APCs ativadas, em particular células de Langerhans, macrófagos e células dendríticas. O receptor de IL-23 está presente em células de memória T, células NK T, macrófagos, células dendríticas e células T *naive*. É a citocina chave que impulsiona a diferenciação de células T *naive* para células Th17 uma vez que na sua ausência o perfil de resposta CD4 resulta na diferenciação de células Treg.

Estudos demonstram que a IL-17 é produzida durante a fase aguda da DC em camundongos e controla a inflamação cardíaca modulando a resposta Th1.⁷⁰

Miyazaki *et al*⁷¹ relataram que a IL-17 produzida durante infecção com *T. cruzi* resulta na ativação eficiente da resposta imune contra o parasita, uma vez que camundongos deficientes dessa citocina apresentaram níveis mais baixos de IFN- γ , prolongada parasitemia e mortalidade quando comparados aos controles. Outros estudos associam a IL-17 à destruição de neurônios em modelos experimentais de EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis).⁷² Poucos estudos relacionam as células Th17 e suas citocinas a doenças digestivas, particularmente no que se refere a lesões da DC

Os estudos acima apontam para a necessidade de se estabelecer os desequilíbrios imunológicos envolvidos na patogênese das lesões digestivas na DC, com enfoque para a ativação das diferentes subpopulações de células CD4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- OMS [Internet]. OMS [Atualizada em: junho/2010; acesso em: 10/06/2012]. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/.
- 2- Lana M, Tafuri WL. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia humana. Edição (1). São Paulo: Atheneu; 2005. 85-108.
- 3- Drauzio Varella.com.br [Internet]. São Paulo: Estação saúde – educação e cultura LTDA. [Acesso em: 10/07/2012]. Doença de Chagas. Disponível em: www.drauziovarella.com.br/doencas-e-sintomas/doenca-de-chagas/.
- 4- Dutra WO, Menezes CAS, Villani FNA, Costa GC, Silveira ABM, d'Avilla Reis D, *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(1): 208-18.
- 5- Umezawa ES, Stolf AM, Corbett CE, Shikanai-Yasuda MA. Chagas' disease. Lancet. 2001; 357: 797– 99.
- 6- Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Paras Immunol. 2009; 31:673-85.
- 7- Tostes Jr S, Lopes ER, Pereira FE, Chapadeiro E. Miocardiopatia chagásica crônica humana: estudo quantitativo de linfócitos CD4+ e CD8+ nos exsudatos inflamatórios. Rev Soc Brasil Med Trop. 1994; 27: 127-34.
- 8- Köberle F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. Adv Parasitol. 1968; 6: 63-116.
- 9- Adad SJ, Cançado CG, Etchebehere RM, Teixeira VP, Gomes UA, Chapadeiro E, Lopes ER. Neuron count reevaluation in the myoenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. Virchows Arch. 2001; 438: 254-58.
- 10- Corbett CE, Ribeiro U Jr, Prianti MG, Habr-Gama A, Okumura M, Gama-Rodrigues J. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. Dis Colon Rectum. 2001; 44: 993-98.
- 11- d'Avila Reis D, Lemos EM, Silva GC, Adad SJ, McCurley T, Correa-Oliveira R, Machado CR. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001; 95: 177-78.
- 12- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Amplification of a *T. cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48: 348-57.
- 13- Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. Lancet. 1996; 348: 891-92.
- 14- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. Am J Pathol. 2000; 156: 1805-1809.
- 15- da Silveira AB, Arantes RM, Vago AR, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, D'Avila Reis D. Comparative study of the presence of *T. cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. Parasitology. 2005; 131: 627-34.

- 16- da Silveira AB, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. *Parasitology*. 2007; 134: 789-96.
- 17- Oliveira EC, Fujisawa MM, Hallal Longo DEM, Farias AS, Moraes JC, Guariento ME, *et al*. Neuropathy of Gastrointestinal Chagas' Disease: Immune Response to Myelin Antigens. *Neuroimmunomodulat*. 2009; 16: 54–62.
- 18- Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today*. 1999; 15: 94–9.
- 19- Tarleton RL. Parasite persistence in the actiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* 2001; 31:550-4.
- 20- Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, *et al*. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92: 3541–45.
- 21- Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today*. 1999; 15: 94–9.
- 22- Acosta AM, Santos-Buch CA. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation* 1985; 71: 1255– 61.
- 23-
- 24- Leon JS, Daniels MD, Toriello KM, Wang K & Engman DM. A cardiac myosin-specific autoimmune response is induced by immunization with *Trypanosoma cruzi* proteins. *Infect Immun* 2004; 72: 3410–17.
- 25- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: the role of NK cells. *Infect Immun*. 1996; 64:128-34.
- 26- Minoprio P, Eisen H, Joskowicz M, Pereira P, Coutinho A. supression of polyclonal antibody production in murine *Trypanosoma cruzi* infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *JImmunol*. 1987; 139: 545-50.
- 27- Tarleton RL. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induce immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 1990; 144: 717-24.
- 28- Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of β 2-microglobulin-deficient mice of *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*. 1992; 356: 338-40.
- 29- Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun*. 1996; 64:1961-7.
- 30- Camargo MM, Almeida IC, Pereira MES, Ferguson MAJ, Travassos LR, Gazzinelli RT. GPI anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of pro-inflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol*. 1997; 158: 5890-1.
- 31- Hunter CA, Slifer T, Araújo F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect Immun*. 1996; 64: 2381-6.
- 32- Nogueira N, Ellis J, Chaplan S, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp Parasitol*. 1981; 51(3) 325–34.
- 33- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen

- oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*. 1992; 22 (10) 2501–6.
- 34- Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*. 1994; 62 (11) 5177–82.
- 35- Silva JS, Vespa GNR, Cardoso MAG, Aliberti JCS, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun*. 1995; 63 (12) 4862–67.
- 36- Rottenberg ME, Cardoni RL, Andersson R, Segura EL, Örn A. Resistance to *Trypanosoma cruzi* requires T helper/inducer cells as well as natural killer cells. *Scand J Immunol*. 1988; 28: 573–82.
- 37- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun*. 1996; 64 (1) 128–34.
- 38- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler MK, Andreson D, Reed SG. Interleukin-10 and interferon- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1992; 175: 169- 74.
- 39- Ortiz-Ortiz L, Ortega T, Capin R, Martinez T. Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1976; 50: 232-42.
- 40- Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 1991; 146: 3626-32.
- 41- Michailowsky V, Murta SMF, Carvalho-Oliveira L, Pereira MES, Ferreira LRP, Brener Z, et al. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benzidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1998; 42(10): 2549-56.
- 42- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 2003; 71: 1185-93.
- 43- Abrahamsohn IA, Coffman R. Cytokine and Nitric Oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 1995; 155: 3955-63.
- 44- Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2001; 158: 1433-40.
- 45- Abrahamsohn IA. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Bras J Medical and Biological Research* 1998; 31: 117-21.
- 46- Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 635-73.
- 47- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114:103-10.
- 48- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James S, Sher A. The microbicidal activity of interferon- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur J Immunol* 1992; 22: 2501-06.
- 49- Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Coffman RL, et al. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scand J Immunol* 1997; 44: 74-80.
- 50- Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol*. 2008; 38:918-21.

- 51- Kotner J, Tarlenton R. Endogenous CD4+CD25+ regulatory T cells have a limited in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun*. 2007; 75:861-9.
- 52- de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Renato Zuquim Antas P, Assis Silva Gomes J, et al. Regulatory T Cells Phenotype in Different Clinical Forms of Chagas' Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(5): e992.
- 53- Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, E. Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999; 59:3128–33.
- 54- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:531–62.
- 55- Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000; 101:455–458.
- 56- Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. 2005; 6:1219–1227.
- 57- Belkaid Y. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in Leishmania infection. *Expert Opin Biol Ther*. 2003; 3:875–885.
- 58- Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat. Med*. 2004; 10:29–30.
- 59- Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4+ CD25+ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med*. 2004; 200: 201–210.
- 60- Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med*. 2003; 198:889–901.
- 61- Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol*. 2004; 34:366–76.
- 62- Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol*. 2001; 167: 1137–40.
- 63- Zhao DM, Thornton AM, Dipaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006; 107: 3925–3932.
- 64- Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*. 2005; 6: 353–60.
- 65- de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PRZ, Gomes JAS, Sathler-Avelar R, et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2011; 5: 992–9.
- 66- de Araújo FF, da Silveira AB, Correa-Oliveira R, Chaves AT, Adad SJ, Fiuza JA. Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Hum Pathol*. 2011; 42: 299–301.
- 67- Araujo FF, Gomes JAS, Rocha MOC, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, et al. Potential role of CD4+CD25High regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci*. 2007; 12: 2797–2806.
- 68- Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat. Rev. Immunol* 2006; 6: 329–333.

69- Stockinger B, Veldhoen M, Martin B. Th17 cells: linking innate and adaptative immunity. *Semin Immunol* 2007; 19: 353-61.

70- da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, *et al.* IL-17 Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(2): e604.

71 - Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimano Y, Iwakura Y, Hiroki Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *Journ Immunol.* 2010; 185:1150-57.

72- Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, *et al.* Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med.* 2009; 15 (8): 946-51.

Capítulo I

Artigo enviado para publicação na PLOS One

**Th17 and Treg cells evaluation in patients with the digestive form of
chronic Chagas disease**

Mariana Miziara de Abreu¹; Mariana Gatto¹; Jéssica Cristina Bilizário Noguerol
Andrade¹; Laura Denise Mendes da Silva¹; Marjorie de Assis Golim²; Érika
Alessandra Pellison Nunes da Costa¹; Rodrigo Mattos dos Santos¹; Paulo
Câmara Marques Pereira¹; Ângela Maria Victoriano de Campos Soares³; Sueli
Aparecida Calvi¹

¹ Tropical Diseases Department, Botucatu School of Medicine – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

² Flow Cytometry Laboratory, Hemocenter, Botucatu School of Medicine – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

³ Microbiology and Immunology Department, Biosciences Institute – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

Corresponding author: marimiziara@gmail.com

ABSTRACT

Chagas disease (CD) whose etiological agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) in recent years became a serious problem of public health even in nonendemic countries. One important challenge for the researchers of Chagas disease is to establish the events that lead some patients to develop asymptomatic or indeterminate chronic disease, while others undergo severe disease with lesions in cardiac or gastrointestinal tissues. Some studies have suggested that absence of clinical symptoms in individuals with the indeterminate chronic form is associated to a fine control of effector immune responses against the parasite that avoid a perpetuated inflammatory process which results in tissue injury. There are no studies aiming to confirm this mechanism in patients with digestive form of the disease, particularly in relation to the modulatory control by Treg cells of effector mechanisms involving Th17. Here, we studied in patients with the digestive form of CD and in those with the indeterminate or asymptomatic form of the disease, the ratio Th17/Treg activation by evaluating the frequency of Th17 and Tregs cells by flow cytometry, mRNA expression for Ror γ t and Foxp3, the transcription factors involved in the differentiation of these cells respectively as well as the levels of IL-17a and IL-10 in peripheral blood mononuclear cells culture supernatants. We showed that in patients with digestive form of the disease there is an imbalance in the ratio Th17/Treg cells activation in favor of Th17, while in

patients with the indeterminate form, this imbalance favour Treg activation. Our findings support the hypothesis that in contrast with indeterminate patients a non regulatory environment observed in patients with digestive CD, which results in an exacerbated inflammatory response exerted by Th17, due to lower Treg activation, may be responsible for tissue lesions in these patients.

INTRODUCTION

Chagas disease (CD) whose etiological agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is a neglected disease, however is a serious problem of public health. It is endemic in Latin America, but in recent decades its detection has increased in the USA, Canada and several European countries, where most of the Latin immigrants are now living. Currently, there are about 10 million people infected worldwide and more than 25 million living in risk areas. The clinical course of chronic disease is variable and ranges from the absence of symptoms to severe disease. Most chronically infected individuals present the indeterminate or asymptomatic chronic disease characterized by positive serology and no clinical manifestations. However, about 30 to 40% of them develop symptomatic CD with cardiovascular (cardiac form) or gastrointestinal (digestive form) involvements [1].

The clinical manifestations of the digestive CD form are attributed to the destruction of myenteric plexus nerves which leads to uncoordinated peristaltic movements, muscle hypertrophy and dilation [2]. Megaesophagus and

megacolon are the major causes of high morbidity in patients with this clinical form. Pathologically, both, esophagus and colon, exhibit a large luminal enlargement and muscle hypertrophy. Histologically, inflammatory infiltrate and fibrosis were found associated with lesions in muscle cells and in intramural nervous system [3-4]. Inflammatory infiltrates composed primarily by T lymphocytes CD3⁺CD4⁺, B cells CD20⁺, NK cells CD57⁺ and macrophages CD68⁺ have been attributed to constant cell activation due to parasite persistence since *T. cruzi* kDNA is frequently detected in chronic lesions [5-9].

Host resistance to infection requires the generation of immune response effector mechanisms able to effectively control the invading pathogen. However, at same time, these mechanisms, if exacerbated, can be closely related to tissue damage. Thus, while the effector elements act to eliminate the parasite, regulatory mechanisms must be activated in order to minimizing tissue damage caused by them [10-11].

Studies have shown that the main host effector mechanisms against *T. cruzi* involve Th1 response with production of IFN- γ and TNF- α which activate cells to eliminate the parasite [12-15]. However, there are few studies evaluating the role of Th17, another important proinflammatory subpopulation of CD4 cells.

Naïve CD4⁺ cells cultured in the presence of TGF- β , IL-6, IL-1 β , IL-23 and IL-21 express the transcription factor ROR γ t ("retinoid-related orphan receptor gamma") and are differentiated in Th17 cells. These cells, which produce IL-

IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 and TNF- α and promote an intense inflammatory process mediated by neutrophils may be associated with resistance against various bacterial and parasitic infections, but also with immunopathology in others [16]. These findings lead us to suppose that protection induced by Th17 occurs in situations where a concomitant modulatory response is induced. Regulatory T cells (Treg cells) are probably the major CD4⁺ cells subset involved in this control.

Treg cells have been described as a CD4⁺CD25⁺ T cells that expresses the transcription factor Foxp3. By producing antiinflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- β these cells regulate innate and adaptive immune responses [17]. They have the ability to suppress the proliferation of CD4⁺ T cells and IFN- γ production, downregulate activation and cytolytic capacity of CD8⁺ T cells as well as modulate humoral immune responses [18-20] Thus, Treg cells can prevent the elimination of infection by removal of crucial effector immune responses, but at same time they can induce a protective response by limiting tissue damage, caused by exacerbated responses [21].

Based on these findings, here, we hypothesized that in contrast with asymptomatic or indeterminated disease, disbalance between Th17 and Treg activation in favor of Th17 profile may be associated to symptomatic disease. Confirming this, our results showed that Th17 cells are preferentially induced in patients with digestive form. On the contrary, Treg cells are predominantly

activated in indeterminate patients, which allow us to conclude that the immunoregulatory environment observed in these patients may be responsible for the maintenance of the asymptomatic state.

MATERIALS AND METHODS

Patients

All patients were recruited from the General Service of Infectious diseases of the Clinical Hospital of Botucatu Medical School, from July 2013 to March 2014. They were conducted to this service by the Blood center from the same hospital when, at the time of blood donation, they had presented at least one positive serological test (ELISA, IF, IHA) for Chagas disease. When they began to be monitored, they underwent more 3 serological tests of different principles (ELISA/Chemiluminescence, IHA and IF), and those who were positive for at least two of these tests were considered as chronic patients.

The groups were divided into:

Digestive (DIG): 23 chronic CD patients with megacolon and/or megaesophagus that presented EKG and chest x-ray without alterations; Radiological examination of esophagus, stomach duodenum or colon with alterations.

Indetermined (IND): 19 chronic CD patients that did not present changes in the electrocardiogram, chest x-ray and radiological examination of esophagus, stomach duodenum or colon.

Healthy Subjects (HS): 20 donors individuals from the Blood Center of the Clinical Hospital of the Botucatu School of Medicine, with more than 70 kg, with negative serology for DC, of both sexes, older than 18 years, and no epidemiological history of CD.

Pregnant women and other patients presenting other simultaneously infectious diseases were excluded from the study. The Research Ethics of the Botucatu Medical School approved this study and all patients and healthy subjects signed a free and informed consent form.

From the 42 patients with CD included in the study, 20 were males and 22 females; 10 males and 13 females with digestive form and 10 men and 9 women with indetermined form. The average age of DIG patients is 55.9 years and the IND is 54.2 years, and the age of the patients ranged between 23 and 72 years. From the 23 patients with digestive CD, 11 had megaesophagus, 1 megagastria, one megaesophagus and concomitant megacolon and 10 had megacolon.

Of the 23 patients included in DIG, 15 had a family history of CD. Already in IND, only 3 patients did not have an immediate family member with CD, and 5 of all the patients had a mother with CD.

Blood Sample Collection

Blood samples (25 ml) were taken from a forearm vein once in all the groups. Blood was collected in heparinized tubes and then centrifuged at 450 g for 10 minutes. Blood samples were used to obtain peripheral blood mononuclear cells

(PBMCs) to RNA extraction, evaluated Th17 and Treg cells by flow cytometry and to measure cytokines in their culture supernatants.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation

PBMCs were obtained from peripheral blood by separation on Histopaque[®] gradient m (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The halo rich in lymphocytes and monocytes was removed and washed by centrifugation with the culture medium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) at 400g for 15 minutes and then centrifuged at 450 g for 15 minutes. The cells were then resuspended in complete medium, consisting of RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 40 µg/ml gentamicin and 10% fetal bovine serum (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brazil). The identification and viability of the cells were performed using Trypan Blue staining and cell concentration was adjusted to 1×10^7 and 1×10^6 cells/ml to perform the protocols.

Foxp3 and Ror γ t mRNA expression

Total RNA was extracted from PBMCs at 1×10^7 cells/ml by the TRIzol method (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm; all samples showed an absorbance value of approximately 2.0. One microgram of RNA was used for the synthesis of 20 µL of complementary DNA (cDNA) by ImProm-II[™] Reverse Transcription System (Promega, Brazil). Foxp3 and Ror γ t mRNA levels were determined by real-time PCR. Primer sequences are shown in Table 1. The β -actin gene was used as an internal control. Relative quantification of each target mRNA was performed using a standard curve-based method for relative real-time PCR data processing with a StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) and

Power SYBR Green PCR Master Mix [22]. The real-time PCR cyclers conditions were 95°C for 10 minutes, followed by 40 annealing cycles at 95°C for 15 seconds and extension at 60°C for 1 minute. Fluorescence signals were collected during the annealing and extension cycle of amplification (60°C for 1 minute). Amplification of specific transcripts was confirmed based on the melting curve profiles generated at the end of each run. The control samples' mean expression was assigned a relative value of 1.0, and concentrations in all other samples were normalized proportionately.

Table 1. Primers for Foxp3, ROR γ t and β -actina.

Gene	Forward Sequence	Reverse Sequence	GenBank	Product Length
ROR γ t	5'CCACAGATTTTGCAAGGGATC A 3'	5'TGAGAAGGACAGGGAGCCAA 3'	NM_001001523. 1	85
Foxp3	5'CCACAGATGAAGCCTTGGTC 3'	5'ACAGTCTCTGGAGCAGCAGC 3'	XM_011543919. 1	101
β -actina	5'CTGGAACGGTGAAGGTGACA 3'	5'AAGGGACTTCCTGTAACAATGC A 3'	XM_006715764. 1	140

Frequency of Treg and Th17 cells

To evaluate the frequency of Treg cells, 100uL of 1×10^7 PBMCs/mL were placed in Falcon tubes for flow cytometry (Becton and Dickinson, BD Company) and centrifuged at 1800 rpm for 5 minutes. After centrifugation, the supernatant was discarded, and the cells resuspended in 100ul of Stain Buffer (FBS) (BD Pharmingen TM (BD-Becton and Dickinson Company), and incubated with anti-CD4 and anti-CD25 monoclonal antibodies surface (BD-Becton Dickinson and Company) for 20 minutes at room temperature in the dark. After the cells, were washed, fixed and permeabilized and then incubated with anti-FoxP3 antibody (BD-Becton and Dickinson Company) for 30 minutes

in the dark at room temperature, washed, fixed with 1% formaldehyde and stored at 4°C until reading.

On the other hand, to evaluate the frequency of Th17 cells, 1 ml of 1×10^6 PBMCs/ml were placed in Falcon tubes for flow cytometer (Becton and Dickinson, BD Company) (1mL / tube) and centrifuged at 1800 rpm for 5 minutes. After centrifugation, the supernatant was discarded, and the cells were resuspended in 50uL of FBS, followed by incubation for 10 minutes at room temperature with 10uL of human AB serum for blocking non-specific Fc bindings. After, the cells were incubated with anti-CD3 and anti-CD4 monoclonal antibodies (BD-Becton Dickinson and Company) for 30 minutes at 4°C in the dark. Cells were washed, fixed and permeabilized and then incubated with anti-IL-17a antibody for 30 minutes in the dark at 4°C, washed, fixed with 1% formaldehyde and stored at 4°C until reading.

For each test, there was a control tube in which cells were incubated with isotype control antibodies conjugated to the same fluorochromes used in the test. Analysis and cell acquisition were performed by flow cytometry (FACSCalibur™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) using the Cell Quest software (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Regarding the gating strategies to distinguish between cells populations analyzed by flow cytometry, FSC-SSC profile was used to distinguish total lymphocytes and this subtype cells were gated according to light scatter profile

and the expression of CD3, CD4 and CD25. Acquisition was standardized to 50,000 events per sample.

Cytokine production

PBMCs (1×10^6 cells/ml in complete medium) were plated in 24-well culture plates and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 hours. After incubation, the supernatants were aspirated and evaluated for the concentrations of the cytokines IL-17a and IL-10 by CBA (Cytometric Beads Array) technique. In this analysis flow cytometry FACSCalibur™ (Becton, Dickinson and Company), and the Cell Quest and FCAP Array™ Softwares (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) were used.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism Version 5.01 for Windows, GraphPad Software, Inc., (San Diego, California - USA). Significant differences for the results referring frequencies of Treg and Th17 cells were calculated by the ANOVA test for independent samples followed by means comparison by Multiple Tukey-Kramer test. For cytokines production and Foxp3 e Rorγt expression Kruskal-Wallis test followed by medians comparison by Multiple comparisons of Dunns were performed. The significance level for all analyses was set at 5%.

RESULTS

Frequency of Th17 and Treg cells

In a first set of experiments, we investigated the ratio Th17/Treg activation in the two groups of patients, by evaluating by flow cytometry the frequency of CD4 cells positive for intracellular IL-17a (Th17) and for surface CD25 and intracellular Foxp3 (Treg).

Patients with digestive CD exhibited a significantly higher frequency of Th17 cells compared with indeterminate patients and HS ($p < 0,05$) (Figure 1A). In contrast they presented lower percentage of Treg cells in comparison to HS ($p < 0,05$) (Figure 1B) and mainly in relation to IND ($p < 0,05$).

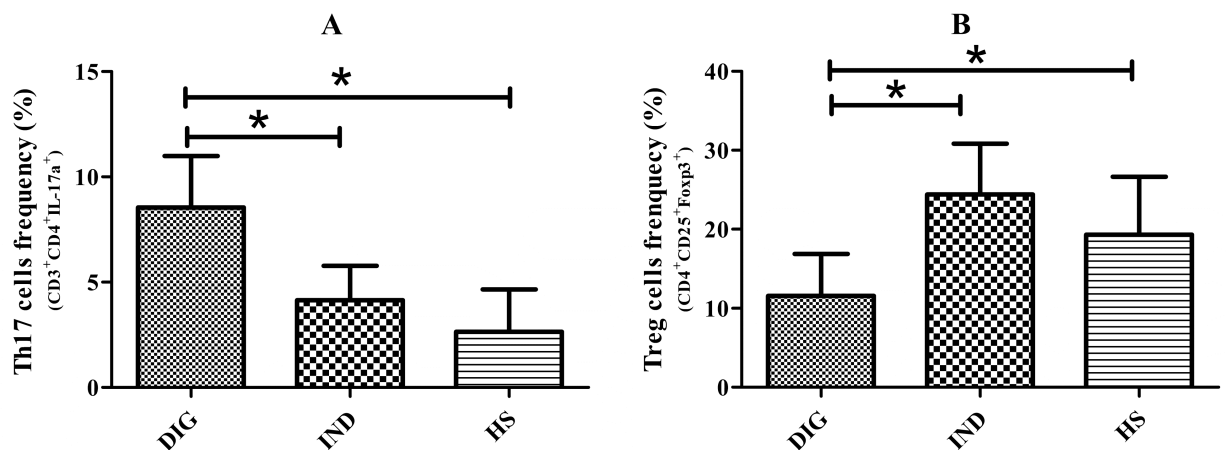


Figure 1. Frequency of Th17 and Treg Cells: (A) Frequency of Th17 cells (CD3⁺CD4⁺IL-17a⁺) in patients with digestive and indetermined form of CD and healthy subjects. (B) Frequency of Treg cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) in patients with digestive and indetermined form of CD and healthy subjects. Gating strategies to distinguish between cell populations analyzed by flow cytometry. FSC-SSC profile was used to distinguish total lymphocytes and this subtype cells were gated according to light scatter profile and the expression of CD3, CD4 and CD25. Acquisition was standardized to 50,000 events per sample. The results are expressed as the mean and standard deviation. * $p < 0.05$.

Roryt and Foxp3 gene expression

On other approach to investigate the ratio Th17/Treg activation was to evaluate in the 3 groups, the gene mRNA expression for the two transcription factors involved in the differentiation of these cells, Roryt and Foxp3 for Th17 and Treg cells respectively.

We observed that DIG expressed significant higher levels of mRNA for Roryt compared to IND ($p < 0,05$) (Figure 2A). An inverse ratio was detected for IND, that expressed higher amount of Foxp3 ($p < 0,05$) (Figure 2B).

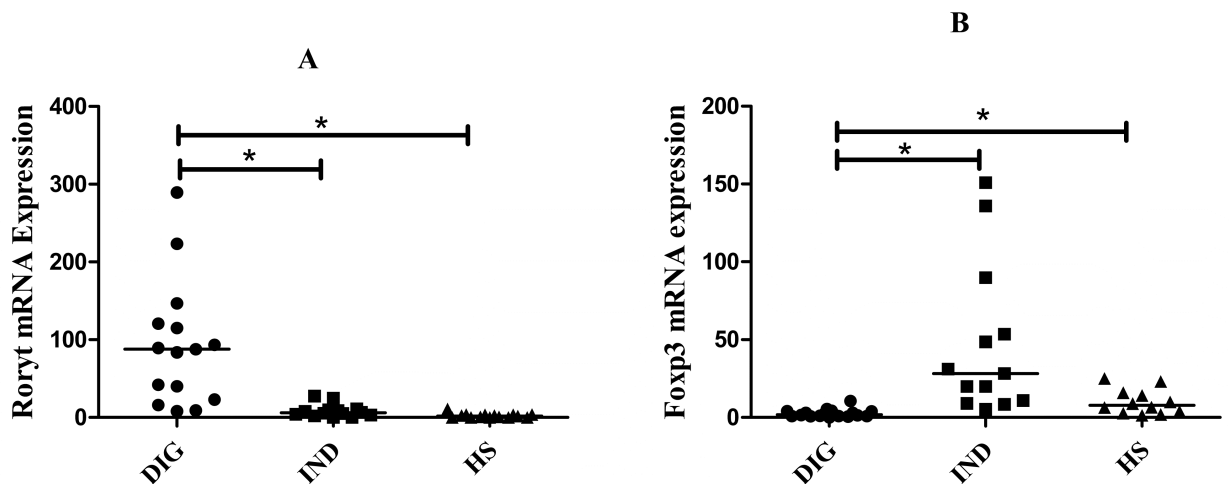


Figure 2. Gene Expression of Roryt and Foxp3: mRNA expression of Th17 and Treg cells transcription factors, Roryt (A) and Foxp3 (B) respectively, in patients with digestive and indetermined form of CD and healthy subjects. Each dot represents a different patient and each bar represents the median.. $*p < 0.05$.

Cytokine production

We also evaluated the production of IL-17 and IL-10 the two cytokines predominantly released for Th17 and Treg respectively. Our data showed that the two groups of patients released lower levels of IL-17 ($p < 0,05$) (Figure 3A)

and IL-10 ($p < 0,05$) (Figure 3B) compared to controls . However, despite there was no significative differences between the two groups of patients, those with indeterminated form trended to release lower levels of IL-17 in relation to digestive ones. In contrast, indeterminate patients trended to release higher levels of IL-10.

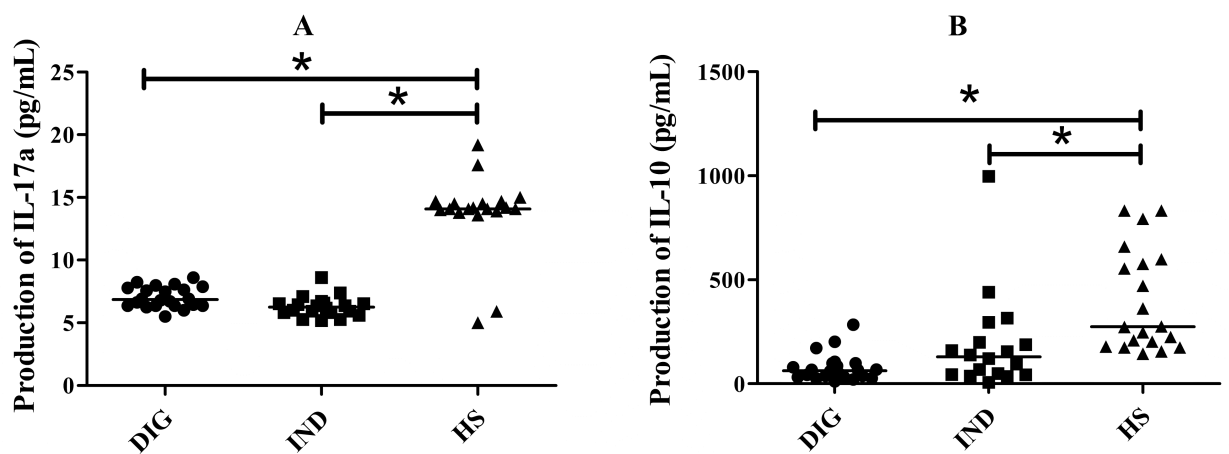


Figure 3. Production of IL-17a and IL-10 in PBMC's culture: Levels of IL-17a (A) and IL-10 (B) in supernatants were analyzed after 24 hours of PBMCs culture (1×10^6 cells/ml), obtained from patients with digestive and indeterminated form of CD and healthy subjects. Each dot represents a different patient and each bar represents the median. $*p < 0.05$.

DISCUSSION

One of the most important challenges for the researchers of Chagas disease is to establish the factors that lead some patients to develop asymptomatic chronic disease, while others undergo severe disease. This issue is probably multifactorial, but one factor in particular has been supported by some studies arguing that the maintenance of asymptomatic state of some patients results

from an environment, where there is a fine regulation of effector mechanisms of the immune response against the parasite, which avoid tissue lesion [23]. However, to our knowledge there are no studies investigating this question in relation to the possible control of effector mechanisms involving Th17, one proinflammatory CD4 subset. In addition, there are no studies involving patients with digestive form of Chagas disease. We hypothesized that in contrast with asymptomatic or indeterminated disease, disbalance between Th17 and Treg cells activation in favor of Th17 may be associated to symptomatic digestive disease. Confirming our hypothesis the results showed that patients with digestive CD showed a significantly higher percentage of Th17 cells compared with indeterminate patients, which was confirmed by the results relative to Ror γ t transcription factor expression. These results are contrary to found in the literature for cardiac patients.

Guedes et al. [24] observed that Chagas patients with no or mild cardiomyopathy had higher frequency of CD4⁺IL-17⁺ compared to patients with moderate/severe cardiomyopathy and controls. Magalhães et al. [25] showed that no chagasic patients have a higher frequency of CD4⁺ IL-17⁺ compared to patients with heart CD.

Some studies have shown that these cells, despite participating in the induction of a protective inflammatory response during infection with *T. cruzi* culminating in the destruction of the parasite, they also may play a regulatory role [26].

Th17 cells inhibit the inflammatory response in the myocardium induced by Th1 cells through its capacity of attracting and activating neutrophils producers of IL-10 [27]. However, as there are no studies evaluating patients with digestive CD and Th17 cells, our results are promising in showing that unlike the studies to date with cardiac patients, patients with the digestive form show an increased frequency of Th17 cells, that instead regulatory, play a predominant proinflammatory role, which may be involved in the lesions of these patients.

Our hypothesis was also confirmed by the results showing that patients with gastrointestinal CD showed a significantly lower frequency of Treg cells as well as lower expression of the transcription factor Foxp3 in comparison with patients with indetermined CD. These results are supported by the literature since Silveira et al. [28] have observed higher frequency of Foxp3⁺ cells in colon biopsies of patients without megacolon compared to those with this lesion. Araújo et al. [29] reported that patients with indeterminate CD had higher frequency of Foxp3⁺CD4⁺CD25^{high} cells compared to patients with cardiac CD.

Still, to confirm our results, IL-17 and IL-10 levels were compared in the two group of patients. Patients DIG showed only a modest tendency to release higher IL-17 levels in relation to IND. However, there was a clear trend of these patients to present lower levels of IL-10. This finding confirms our hypothesis and is supported by studies detecting increased IL-10 levels in patients with indetermined CD when compared with cardiac CD [30]. However, these

information are in contrast with the results found by Pisseti et al. [31], which reported an increase in IL-10 levels in patients with gastrointestinal CD compared with indeterminated form suggesting that this cytokine might be in favor of a Th2 shift, inhibiting a Th1 effector response.

Taken together our findings support the argument that in contrast with indeterminated patients a non regulatory environment observed in patients with digestive CD, which results in an exacerbated inflammatory response exerted by Th17 may be responsible for tissue lesions in these patients.

CONCLUSIONS

We showed that in patients with digestive form of CD there is an imbalance in the ratio Th17/Treg cells activation in favor of Th17, while in patients with the indeterminated form, this imbalance favour Treg activation. Our findings support the hypothesis that in contrast with indeterminated patients, a non regulatory environment observed in patients with digestive CD, which results in an exacerbated inflammatory response exerted by Th17, due to lower Treg activation, may be responsible for tissue lesions in these patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge all patients and the healthy volunteers for their willingness to participate in this study. We also thank the Infectious Diseases Department at Botucatu Medical School – UNESP.

REFERENCES

- [1] WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Available in www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/. Accessed 10 June 2012.
- [2] Tostes Jr S, Lopes ER, Pereira FE, Chapadeiro E. (1994) Miocardiopatia chagásica crônica humana: estudo quantitativo de linfócitos CD4+ e CD8+ nos exsudatos inflamatórios. *Rev Soc Brasil Med Trop.* 27: 127-34.
- [3] Köberle F. (1968) Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol.* 6: 63-116.
- [4] Adad SJ, Cançado CG, Etchebehere RM, Teixeira VP, Gomes UA, Chapadeiro E, Lopes ER. (2001) Neuron count reevaluation in the myoenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch.* 438: 254-58.
- [5] Corbett CE, Ribeiro U Jr, Pianti MG, Habr-Gama A, Okumura M, Gama-Rodrigues J. (2001) Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. *Dis Colon Rectum.* 44: 993-98.
- [6] d'Avila Reis D, Lemos EM, Silva GC, Adad SJ, McCurley T, Correa-Oliveira R, Machado CR. (2001) Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95: 177-78.
- [7] Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. (1993) Amplification of a *T. cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* 48: 348-57.
- [8] Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R. (1996) PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet.* 348: 891-92.
- [9] Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. (2000) Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 156: 1805-1809.
- [10] Belkaid Y. (2008) Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol.* 38:918-21.
- [11] Kotner J, Tarlenton R. (2007) Endogenous CD4+CD25+ regulatory T cells have a limited in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* 75:861-9.
- [12] Nogueira N, Ellis J, Chaplan S, Cohn Z. (1981) *Trypanosoma cruzi*: in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp Parasitol.* 51: 325-34.

- [13] Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. (1992) The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* 22: 2501–6.
- [14] Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. (1994) Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun.* 62: 5177–82.
- [15] Silva JS, Vespa GNR, Cardoso MAG, Aliberti JCS, Cunha FQ. (1995) Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.* 63: 4862–67.
- [16] Dong C. (2006) Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 329–333.
- [17] de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Renato Zuquim Antas P, Assis Silva Gomes J, et al. (2011) Regulatory T Cells Phenotype in Different Clinical Forms of Chagas' Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 5: e992.
- [18] Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM. (2004) Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol.* 34:366–76.
- [19] Piccirillo CA, Shevach EM. (2001) Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* 167: 1137–40.
- [20] Zhao DM, Thornton AM, Dipaolo RJ, Shevach EM. (2006) Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood.* 107: 3925–3932.
- [21] Belkaid Y, Rouse BT. (2005) Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 6: 353–60.
- [22] Larionov A, Krause A, Miller WR (2005) A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 21: 6–62.
- [23] Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, Gollob KJ (2014) Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol* 36: 377-387.
- [24] Guedes PMM, Gutierrez FRS, Silva GK, Dellalibera-Joviliano R, Rodrigues GJ, et al. (2012) Deficient Regulatory T Cell Activity and Low Frequency of IL-17-Producing T Cells Correlate with the Extent of Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1630. doi:10.1371/journal.pntd.0001630.
- [25] Magalhães LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. (2013) High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis.* 207: 661-5.

- [26] da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, et al. (2010) IL-17 Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. PLoS Negl Trop Dis. 4: e604.
- [27] Tosello Boari J, Amescua Vesely MC, Bermejo DA, Ramello MC, Montes CL, Cejas H, Gruppi A, Acosta Rodrigues EV. (2012) IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. PLoS Pathog. 8: e1002658.
- [28] Silveira AMB, Araújo FF, Freitas MAR, Gomes JAS, Chaves AT, Oliveira EC, et al. (2009) Characterization of the presence and distribution of Foxp3+ cells in chagasic patients with and without megacolon. Hum Immunol. 70: 65-7.
- [29] Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, Fares RC, et al. (2012) Foxp3+CD25(high)CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effectors cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. Immunobiology. 217: 768-77.
- [30] Sousa GR, Gomes JAS, Fares RCG, Dama'sio MPdS, Chaves AT, et al. (2014) Plasma Cytokine Expression Is Associated with Cardiac Morbidity in Chagas Disease. PLoS ONE. 9: e87082. doi:10.1371/journal.pone.0087082.
- [31] Pisseti CW, Correia D, Braga T, Faria GE, Oliveira RF, Ribeiro BM, Rodrigues DB, Rodrigues V. (2009) Association between the plasma levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, Nitric Oxide and IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop. 42: 425-30.

Conclusão

No presente estudo, observamos que em pacientes com a forma digestiva da DC há um desequilíbrio na relação de células Th17/Treg, favorecendo o perfil Th17, enquanto que em pacientes com a forma indeterminada, este desequilíbrio favorece o perfil Treg. Nossos resultados apoiam a hipótese de que o desequilíbrio observado favorecendo Th17 no grupo de pacientes digestivos, pode resultar em uma resposta inflamatória exacerbada, e, juntamente com uma menor ativação de células Treg, que geraria um ambiente não regulador, podem ser os responsáveis pelas lesões dos tecidos gastrointestinais apresentadas por estes pacientes.

Anexos



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Portadores da doença de Chagas)

A doença de Chagas crônica, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, pode se manifestar nas formas cardíaca e/ou digestiva, ou ainda permanecer assintomática pelo resto da vida do indivíduo. Acredita-se que algumas substâncias são produzidas por determinadas células para o controle ou manutenção da infecção. E ainda, não se sabe nenhum marcador biológico que possa afirmar se um paciente sem sintomas vai desenvolver a forma digestiva da doença. Os resultados obtidos nesta pesquisa serão utilizados para um melhor entendimento do desenvolvimento dos sintomas digestivos da doença de Chagas.

Eu, _____ recebi pessoalmente o convite para participar da pesquisa: “**Análise do padrão de resposta Th17, de células T regulatórias e do proteoma em pacientes com doença de Chagas digestiva crônica**”, a ser realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob responsabilidade da biomédica Mariana Miziara de Abreu e da Prof. Assist. Dra. Sueli Aparecida Calvi do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, e todas informações a respeito do mesmo. Fui devidamente informado sobre os objetivos e procedimentos envolvidos que consistem em: coleta de 25 mL de sangue através de punção venosa em um único momento do estudo. Fui informado que os procedimentos realizados não acarretarão nenhum risco para minha saúde e o único desconforto será a coleta de sangue para o estudo. Ficou esclarecido que a minha participação é voluntária e que tenho a liberdade para me retirar da pesquisa em qualquer momento. Fui assegurado que os dados serão mantidos em sigilo e que minha privacidade será resguardada. Fui informado que meu sangue será estocado e caso utilizado futuramente um novo TCLE será enviado para mim. Declaro que este documento está sendo passado em duas vias, sendo que uma cópia ficará comigo e outra será mantida em arquivo pelo pesquisador. Com a assinatura abaixo, dou consentimento para a incorporação dos meus dados neste estudo.

Qualquer dúvida adicional, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do telefone: (14) 3880-1608/ 1609/ 1610.

Botucatu, de de .

Assinatura do paciente

Assinatura da pesquisadora

Sueli Aparecida Calvi CrBio: 20.086
End: Rua Fausto Lyra Brandão, 211, Vila Nogueira, Botucatu
Tel: 14 97758841; E-mail: sacalvi@fmb.unesp.br
Lab. de Doenças Tropicais: (14) 3880-1641

Mariana Miziara de Abreu CRBM: 17.691
End: Rua Julio Vaz de Carvalho, 602 Pq. Paulista, Botucatu
Tel: 14 81271146 Email: marimizara@gmail.com
Lab. de Doenças Tropicais: (14) 3880-1641



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Grupo controle)

A doença de Chagas crônica, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, pode se manifestar nas formas cardíaca e/ou digestiva, ou ainda permanecer assintomática pelo resto da vida do indivíduo. Acredita-se que algumas substâncias são produzidas por determinadas células para o controle ou manutenção da infecção. E ainda, não se sabe nenhum marcador biológico que possa afirmar se um paciente sem sintomas vai desenvolver a forma digestiva da doença. Os resultados obtidos nesta pesquisa serão utilizados para um melhor entendimento do desenvolvimento dos sintomas digestivos da doença de Chagas.

Eu, _____ recebi pessoalmente o convite para participar da pesquisa: “**Análise do padrão de resposta Th17, de células T regulatórias e do proteoma em pacientes com doença de Chagas digestiva crônica**”, a ser realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob responsabilidade da biomédica Mariana Miziara de Abreu e da Prof. Assist. Dra. Sueli Aparecida Calvi do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, e todas informações a respeito do mesmo. Fui devidamente informado sobre os objetivos e procedimentos envolvidos que consistem em: coleta de 25 mL de sangue através de punção venosa em um único momento do estudo. Fui informado que os procedimentos realizados não acarretarão nenhum risco para minha saúde e o único desconforto será a coleta de sangue para o estudo. Ficou esclarecido que a minha participação é voluntária e que tenho a liberdade para me retirar da pesquisa em qualquer momento. Fui assegurado que os dados serão mantidos em sigilo e que minha privacidade será resguardada. Fui informado que meu sangue será estocado e caso utilizado futuramente um novo TCLE será enviado para mim. Declaro que este documento está sendo passado em duas vias, sendo que uma cópia ficará comigo e outra será mantida em arquivo pelo pesquisador. Com a assinatura abaixo, dou consentimento para a incorporação dos meus dados neste estudo.

Qualquer dúvida adicional, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do telefone: (14) 3880-1608/ 1609/ 1610.

Botucatu, de de .

Assinatura do paciente

Assinatura da pesquisadora

Sueli Aparecida Calvi CrBio: 20.086
End: Rua Fausto Lyra Brandão, 211, Vila Nogueira, Botucatu
Tel: 14 97758841; E-mail: sacalvi@fmb.unesp.br
Lab. de Doenças Tropicais: (14) 3880-1641

Mariana Miziara de Abreu CRBM: 17.691
End: Rua Julio Vaz de Carvalho, 602 Pq. Paulista, Botucatu
Tel: 14 81271146 Email: marimizara@gmail.com
Lab. de Doenças Tropicais: (14) 3880-1641

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do padrão de resposta Th17, de células T regulatórias e do proteoma em pacientes com doença de Chagas digestiva crônica

Pesquisador: Mariana Miziara de Abreu

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12856213.9.0000.5411

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu ((HCFMB))

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu ((HCFMB))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 233.415

Data da Relatoria: 01/04/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo observacional em que serão avaliados 40 pacientes com doença de Chagas, sendo 20 com a forma digestiva e 20 com a forma indeterminada, maiores de 18 anos, de ambos os sexos e acompanhados no Ambulatório de Moléstias Infeciosas Geral, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, além de 20 controles, doadores de sangue, com sorologia negativa para Doença de Chagas e sem antecedentes epidemiológicos para Doença de Chagas. Após a obtenção do TCLE, todos os sujeitos serão submetidos à coleta de 25ml de sangue em um único momento. O sangue será então processado para 1. Obtenção de células mononucleares totais do sangue periférico; 2. Obtenção de sobrenadante de cultura de células mononucleares totais para dosagem de citocinas; 3. Quantificação da expressão gênica dos fatores de transcrição Foxp3 e ROR γ t pela PCR em Tempo Real; 4. Avaliação das células Treg e Th17 por citometria de fluxo; 5. Avaliação da produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares (TNF- γ , IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-17, IL-6, IL-22 e TGF- β); 6. Análise dos peptídeos por bioinformática proteômica, visando identificar e quantificar as proteínas expressas, na busca por biomarcadores para a forma digestiva da Doença de Chagas. A análise proteômica será realizada em apenas 5 pacientes de cada grupo. Os experimentos serão desenvolvidos no Laboratório de Pesquisas do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu e no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro do

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP **Município:** BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a participação da resposta de padrão Th17, Treg e do proteoma no desenvolvimento das manifestações clínicas da Doença de Chagas crônica digestiva.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Favorável, acarretando o desconforto da coleta de sangue aos sujeitos. Por outro lado, os resultados obtidos por este estudo poderão elucidar aspectos envolvidos na patogênese da Doença de Chagas, além da identificação de possíveis biomarcadores de evolução da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto atende aos requisitos das resoluções de pesquisa em seres humanos, está claro e bem redigido, e trata de tema pertinente e negligenciado. O projeto de pesquisa está adequado, contendo introdução, justificativa, objetivos, casuística e métodos bem estruturados. Todos os procedimentos estão minuciosamente descritos no protocolo de pesquisa e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O TCLE, redigido separadamente para controles e pacientes, está adequado, já que está em forma de convite, deixa claro que a participação é voluntária, garante o sigilo e a privacidade e descreve os procedimentos a que os sujeitos serão submetidos, com linguagem clara e acessível. O cronograma de execução foi estimado em 24 meses. O orçamento foi estimado em R\$ 59000,00 (custeio próprio) para compra de anticorpos, kits de citocinas e reagentes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No processo constam as autorizações para o desenvolvimento da pesquisa assinadas pelo chefe do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem e pelos responsáveis do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, além da autorização para manipulação de prontuários assinada pelo chefe do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu. Constam, também do processo, o termo de compromisso quanto ao cumprimento da resolução 196, bem como o da entrega do relatório final, assinados pela autora.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as recomendações anteriormente expostas foram atendidas pela autora. Dessa forma, sou de parecer favorável à aprovação por este CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Telefone: (14)3880-1608

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião do CEP de 01 de abril de 2.013, sem necessidade de envio à CONEP.

BOTUCATU, 01 de Abril de 2013

Assinador por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador)

Endereço: Chácara Bufignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3680-1606

CEP: 16.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br