



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

**Papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de citocinas em  
pacientes chagásicos crônicos**

**Laura Denise Mendes da Silva**

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. Dr<sup>a</sup> Sueli Aparecida Calvi.

Coorientadora: Profa. Dr<sup>a</sup> Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

**Botucatu**

**2016**

Laura Denise Mendes da Silva

Papel dos receptores TLR-2 e TLR-4 na produção de  
citocinas em pacientes chagásicos crônicos

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.Dr<sup>a</sup> Sueli Aparecida Calvi

Coorientadora: Profa.Dr<sup>a</sup> Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

**Botucatu**

**2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Laura Denise Mendes da.

Papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de citocinas em pacientes chagásicos crônicos / Laura Denise Mendes da Silva. - 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

Capes: 21104000

1. Chagas, Doença de. 2. Citocinas. 3. Receptores Toll-like. 4. Sistema imune.

Palavras-chave: Citocinas; Doença de Chagas; Receptores Toll-like; Sistema imune.



*Epígrafe*



*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei  
para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser,  
mas Graças a Deus,  
não sou o que era antes”.*  
*(Marthin Luther King)*



*Dedicatória*



*Dedico este trabalho a minha mãe, meu pai in memoriam e  
a meus irmãos.*

*Pessoas fundamentais que sempre me apoiaram e  
incentivaram em todos os caminhos que segui na vida. Sem  
eles nada seria possível.*

*A minha querida orientadora, Profa Sueli Aparecida Calvi  
que tornou possível a realização desse projeto.*



*Agradecimientos*

*Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho e me guiar sempre nos momentos mais difíceis, me mostrar soluções e pessoas abençoadas que me ajudaram.*

*Agradeço a minha mãe Marlene pelas palavras de apoio, dizeres de sabedoria, carinho, compreensão, amizade, companheirismo e, sobretudo, por acreditar em mim. Obrigada por toda educação e senso de humanidade recebido durante a vida toda.*

*Agradeço ao meu pai Ataíde (in memoriam) todo carinho, compreensão, apoio e educação durante os anos que permaneceu em minha vida e lições que serão para o resto da vida.*

*Agradeço ao meu irmão Ataíde por todo apoio, incentivo, palavras sábias nos momentos difíceis, risadas, companheirismo e sua alegria contagiante.*

*Agradeço a minhas irmãs Rosemary e Rosana que mesmo distantes me apoiaram sempre.*

*Agradeço a minha amiga Meire por ajudar a tornar meus sonhos em realidade e sempre acreditar que tudo é possível.*

*Agradeço a Casa de Estudantes de Botucatu (Arca), lugar onde conheci pessoas especiais, engraçadas, amigas. Lugar onde todo o cansaço ia embora depois de um longo dia de trabalho.*

*Agradeço a minha amiga Juliana por sempre me ajudar quando precisei, ouvir meus desabafos, pelas risadas, amizade e companheirismo.*

*Agradeço aos meus amigos Telma e o Fio pelas conversas, os cafés, as ajudas em tempos difíceis, são pessoas abençoadas por Deus.*

*Agradeço a minha amiga Elisângela por ajudar com minhas bagunças e sua amizade.*



*Agradeço a minha amiga Mariana Gatto por toda ajuda durante o mestrado, risadas, cafés, apoio, desabafos, e incentivo nos momentos difíceis. Muito obrigada por tudo.*

*Agradeço a minha amiga Francilene pelo apoio nos momentos difíceis, companheirismo, momentos alegres e engraçados mesmo com as dificuldades, desabafos, incentivo, comidas e parceria. Muito obrigada por tudo.*

*Agradeço a minha amiga Mizi por toda sua ajuda durante o mestrado, apoio e cooperação.*

*Agradeço aos meus amigos do laboratório Karen, Thaysa, Patrícia, Andréia, Jéssica, Vanessa, Drica, Thaty, Beatriz, Lariza, Pananã, Dani Moris, James e Rodrigo. Obrigada a todos pelo apoio constante e convivência diária.*

*A todas do Laboratório de Citometria de Fluxo, Léia, Aline, Carol e Dra. Marjorie, obrigada pela ajuda na realização do trabalho, análises e todo conhecimento compartilhado.*

*Agradeço ao Dr. Paulo e Dra. Érika por ajudar na triagem dos pacientes chagásicos.*

*Agradeço a Dra. Izoete todo apoio e incentivo para chegar a Unesp e seguir este caminho. Obrigada por tudo.*

*Agradeço a amiga Dani, pela ajuda, pelos conselhos, amizade e apoio. Obrigada por tudo.*

*Agradeço a co-orientadora Prof Dra Ângela que com maestria conduziu a orientação desse trabalho por motivos de força maior, obrigada pela orientação e apoio nos momentos difíceis que passamos durante o trabalho.*

*Obrigada por compartilhar de sua sabedoria e conhecimento.*

*Agradeço a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sueli, que me abriu as portas do laboratório e proporcionou a realização deste trabalho. Obrigada por ter participado de tantos momentos, por ter compreendido minhas dificuldades e, sobretudo, por ter acreditado em mim. Seu apoio foi fundamental desde o início e me deu forças para poder ser bem sucedida em minhas tarefas. Todo seu ensinamento, conhecimento, sabedoria e amizade ficarão eternizados.*



*Grata...*

*...a todos que contribuíram para a realização desse trabalho;*

*Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu- FMB e Seção  
de Pós-Graduação da FMB.*

*Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por  
Imagem, chefes, coordenadores e funcionários.*

*Capes, pela bolsa concedida durante o trabalho.*

*Obrigada em especial aos pacientes chagásicos e doadores de  
sangue que se disponibilizaram com simplicidade a cooperar  
com o trabalho voluntariamente. Sem eles a realização deste  
não seria possível.*



*Aos colegas e funcionários da UNIPEX.*

*À banca do Exame Geral de Qualificação, Prof.º Dr.º Sílvio  
Luís de Oliveira e a Dra.ª Daniela Ramos Rodrigues, pela  
cooperação, disposição e sugestões, que foram de extrema  
importância para este trabalho.*



*Resumo*

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é uma doença negligenciada e considerada um grave problema de saúde pública. A sua evolução no indivíduo infectado ocorre em duas fases distintas: a fase aguda que dura de 2 a 4 meses, caracterizada pela alta parasitemia, mas ausência de sinais e sintomas específicos, o que dificulta sua detecção, e a fase crônica na qual a maioria dos indivíduos é diagnosticada. Nessa fase, uma boa parte dos indivíduos apresenta a forma indeterminada ou assintomática da doença. No entanto, cerca de 30 a 40% dos indivíduos infectados desenvolvem a DC sintomática, que pode se apresentar na forma de doença cardíaca ou doença digestiva. Um dos desafios mais importantes no estudo da DC é a determinação dos mecanismos relacionados à resposta imune do hospedeiro que levam a essas diferentes apresentações clínicas. A resposta imune celular via liberação das citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 é considerada determinante na resistência do hospedeiro. No entanto, um fino controle da liberação dessas citocinas deve ocorrer para que a resposta não se intensifique ou não se perpetue e resulte em lesão tecidual, o que ocorre através da ativação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- $\beta$ . Esse controle de resposta seria responsável pelo não aparecimento de sintomas nos indivíduos com doença de Chagas assintomática. Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), particularmente os *Toll-Like Receptors* (TLRs) são extremamente importantes na definição do perfil de citocinas que será liberado em resposta a um microrganismo. Assim, a nossa hipótese foi de que pacientes com as formas sintomáticas e assintomáticas da doença liberam um padrão de citocinas mais inflamatório e anti-inflamatório respectivamente, devido ao fato de que os TLRs envolvidos na produção desses dois tipos de citocinas, com enfoque para o TLR2 e o TLR4, seriam diferentemente expressos ou ativados nesses dois grupos. Como esperado, detectamos que, células mononucleares de pacientes com a forma cardíaca liberam predominantemente IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 quando comparados com os demais grupos. Diferentemente, pacientes com a forma

assintomática liberam níveis maiores de IL-10 e TGF- $\beta$ . Detectamos ainda que o TLR2 e o TLR4 estão envolvidos tanto na produção de citocinas pró como anti-inflamatórias, detectadas respectivamente pelos pacientes sintomáticos e assintomáticos, o que nos permite concluir que a estimulação dos mesmos receptores pode levar a liberação de um padrão diferente de citocinas na dependência do grupo de pacientes testados. Os prováveis mecanismos que levam a essas diferenças são discutidos.



*Abstract*

Chagas disease (CD), caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), is a neglected disease and considered a serious problem of public health. Its evolution in a infected host occurs in two distinct stages: the acute stage which lasts 2 to 4 months and is characterized by high parasitemia, but no detection of specific signs and symptoms, which difficult its detection, and the chronic stage in which most individuals are diagnosed. At this second stage, most individuals present the indeterminate or asymptomatic chronic disease. However, about 30 to 40% of them become symptomatic and present the cardiac or digestive disease. One of the most important challenges in the CD study is to determine the mechanisms related to the host immune response that lead to these different clinical manifestations. The cellular immune response characterized by the release of pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 is considered crucial in host resistance. However, it is suggested that a fine control of this response must occur in order to avoid a perpetuated inflammatory process which results in tissue injury. This control was found to be responsible by the absence of clinical symptoms in individuals with the indeterminate chronic form and depends on activation of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$ . The pattern recognition receptors (PRRs), particularly the *Toll-Like Receptors* (TLRs) are extremely important in defining the cytokine profile that will be released in response to a microorganism. Therefore, our hypothesis was that patients with symptomatic and asymptomatic disease release different profile of cytokines, i.e pro-inflammatory and anti-inflammatory respectively, because TLRs involved in the production of each profile of cytokines, would be differently expressed or activated in these two groups. As expected, we found that mononuclear cells of patients with the cardiac form release predominantly IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 when compared with other groups. In contrast, patients with asymptomatic disease release predominantly IL-10 and TGF- $\beta$ . Of note, TLR2 and TLR4 were involved in the production of both, inflammatory and anti-

inflammatory cytokines detected in symptomatic and asymptomatic patients, respectively. We conclude that stimulation of these receptors may lead to release of different profiles of cytokines in a dependency of the patients group that is being evaluated. Probable mechanisms involved in such differences are discussed.



*Sumário*

## SUMÁRIO

*Resumo*  
*Abstract*

### CAPÍTULO I

<b>Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>1</b>
Doença de Chagas.....	1
Doença de Chagas e Resposta Imune.....	3
Doença de Chagas e Receptores Toll-like.....	7
<b>Justificativa.....</b>	<b>10</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>11</b>
Objetivo Geral.....	11
Objetivos Específicos.....	11
<b>Casuística.....</b>	<b>12</b>
<b>Métodos.....</b>	<b>13</b>
Formação dos grupos.....	13
Critérios de Inclusão.....	13
Critérios de Exclusão.....	14
Coleta de sangue.....	14
Obtenção de células mononucleares do sangue periférico.....	14
Cultura de células mononucleares do sangue periférico com agonistas de TLR2 e TLR4.....	15
Determinação da produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares totais do sangue periférico.....	15
Avaliação da expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de células mononucleares do sangue periférico por citometria de fluxo.....	15
Análise Estatística.....	16
<b>Resultados .....</b>	<b>17</b>
Avaliação da expressão dos receptores TLR2 e TLR4 por linfócitos e monócitos.....	17
Participação dos TLR2 e TLR4 na produção de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-10 e TGF- $\beta$ .....	21
<b>Discussão.....</b>	<b>27</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>32</b>
<b>Referência Bibliográficas.....</b>	<b>33</b>

### ANEXOS

<b>Anexo 1: Artigo Científico .....</b>	<b>44</b>
<b>Anexo 2: Parecer do CEP.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexo 3: TCLE pacientes .....</b>	<b>76</b>
<b>Anexo 4: TCLE controle .....</b>	<b>77</b>
<b>Anexo 5: Mudança do título do projeto de pesquisa.....</b>	<b>78</b>



*Capítulo I*

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### *Doença de Chagas*

A doença de Chagas (DC) tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que pertence à ordem *Kinetoplastida* e família *Tripanosomatidae*.<sup>1,2</sup> As formas infectantes do *T. cruzi*, são as tripomastigotas metacíclicas contidas nas fezes do inseto vetor hematófago triatomíneo que penetram facilmente através das mucosas e conjuntivas ou de qualquer solução de continuidade da pele. Não atravessam a pele íntegra, mas o próprio local da picada do inseto pode constituir a porta de entrada, se contaminada com dejeções que esses hemípteros costumam emitir enquanto se alimentam. Feridas ou escoriações causadas pelo coçar ( que é motivado pela resposta alérgica à saliva do triatomíneo) são pontos favoráveis para a invasão. A transmissão da doença também pode ser vertical, oral, por aleitamento materno, acidentes laboratoriais, transfusão de sangue e transplante de órgãos<sup>3-5</sup>

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde a incidência anual desta doença nas Américas é de 28.000 casos, o que afeta aproximadamente de 6 a 8 milhões de pessoas e causa 12.000 mortes por ano. Estima-se que 65 milhões de pessoas vivem em áreas de exposição com risco de contrair esta doença nas Américas.<sup>6</sup> No Brasil, dados do Ministério da Saúde relatam que cerca de 2 a 3 milhões de pessoas são portadoras da doença de Chagas crônica.<sup>4</sup> Porém, a DC aguda também tem sido observada em diferentes estados, principalmente na Amazônia Legal devido à transmissão oral. O aumento da mobilidade populacional e a migração de pessoas infectadas, fez com que a doença tenha se expandido por todo o mundo.<sup>4,6,7</sup>

O número de casos relatados com ou sem doença cardíaca tem aumentado recentemente, especialmente em países da Europa como Espanha, Itália e Suíça, onde estão a maioria dos imigrantes latino americanos.<sup>8-10</sup> Embora a transmissão vetorial não possa ocorrer na Europa, devido a ausência do vetor, a DC pode ser transmitida em países não endêmicos

através da transmissão vertical, transfusão de sangue e transplante de órgãos. Algumas medidas de controle de transmissão foram implementadas em alguns países, a fim de diminuir o risco de propagação da doença dentro das fronteiras europeias<sup>11-13</sup>, mas têm se mostrado insuficientes.

O CDC (Center of Disease Control and Prevention) estima que nos EUA mais de 300.000 pessoas estejam infectadas com o *T.cruzi*. A maioria das pessoas com DC nos EUA adquiriram a infecção em países endêmicos. Embora existam triatomíneos nos EUA, casos raros da doença de Chagas por vetores foram documentados.<sup>14</sup>

A evolução da doença envolve duas fases, cada uma com características clínicas distintas. A fase aguda tem duração de 2 a 4 meses, geralmente é caracterizada por sintomas inespecíficos, com exceção do edema de mucosa no local da infecção (referido como sinal de Romaña quando presente no olho), sendo acompanhada por uma intensa parasitemia em muitos órgãos e tecidos.<sup>15,16</sup> Ainda durante essa fase, os pacientes apresentam linfadenopatia, esplenomegalia e uma excessiva ativação do sistema imune que resulta em um intenso processo inflamatório associado, no entanto, com ninhos do parasita nos tecidos.<sup>17</sup> A falta de tratamento e a ineficiência do sistema imune em eliminar completamente o parasita garante sua persistência no organismo, e o indivíduo evolui para a fase crônica da doença.<sup>18</sup> O curso clínico da doença crônica é variável e vai desde a ausência de sintomas até a doença grave com comprometimento cardiovascular ou gastrointestinal.<sup>19</sup> A maioria dos indivíduos infectados apresenta a forma indeterminada ou assintomática da doença crônica, caracterizada por sorologia positiva e ausência de manifestações clínicas. Pacientes indeterminados apresentam um exemplo de co-adaptação entre hospedeiro e parasita na doença de Chagas.<sup>20</sup> Esta fase pode durar meses ou a vida toda. No entanto, cerca de 30 a 40 % dos indivíduos infectados, eventualmente, desenvolvem DC sintomática.<sup>21</sup> A doença cardíaca é a manifestação clínica mais importante da DC crônica sintomática, devido a sua

frequência e gravidade.<sup>22-23</sup> A sua classificação baseia-se nos sintomas, anormalidades no ECG (eletrocardiograma) e mudanças na função ventricular.<sup>16</sup> Também pode ser observado no coração do paciente chagásico cardíaco, danos na condução e na estrutura muscular, ou ambos, sendo comum o aumento do coração e a perda da função contrátil.<sup>24</sup> Na doença digestiva as manifestações gastrointestinais são resultado da lesão do sistema nervoso entérico causado pela infecção pelo *T.cruzi*.<sup>25,26</sup> Nesta forma, há o aparecimento de megaesôfago e megacólon com presença de infiltrados linfocíticos focais e degeneração neural com denervação no esôfago e intestino.<sup>27</sup> Em muitos casos ocorre a dilatação das estruturas digestivas com a perda da motilidade do esôfago e intestino.<sup>20</sup>

### ***Doença de Chagas e resposta imune***

A resposta imune contra o *T. cruzi* é complexa e envolve muitos componentes efetores e reguladores.<sup>28</sup> Tanto os mecanismos de resposta imune inata, como os da adquirida são necessários para a resistência do hospedeiro, o que requer envolvimento de inúmeros tipos celulares como as células fagocíticas, células *Natural Killer* (NK), linfócitos B, linfócitos TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>.<sup>29-32</sup>

Os mecanismos de resposta imune inata propostos para o controle do parasitismo intracelular do *T. cruzi*, durante a fase aguda da doença, envolvem inicialmente a produção dos Interferons do tipo I<sup>33</sup> e outras citocinas que terão como função principal a ativação de macrófagos que produzirão moléculas efetoras tripanossomicidas, como o NO.<sup>34,35</sup> Nesta fase, macrófagos infectados e mesmo células dendríticas (DCs) produzem citocinas como a IL-12 e TNF- $\alpha$  que estimulam as células NK a produzirem IFN- $\gamma$  que ativa macrófagos. Uma vez ativadas, essas células liberam TNF- $\alpha$  que de uma forma autócrina, induz um segundo sinal de ativação nessas células, que aumentam sobremaneira a produção de NO. As células NK, estão presentes em grande quantidade em pacientes chagásicos crônicos, mas

especialmente em indivíduos indeterminados. Além de exercerem o seu papel modulador através da produção de IFN- $\gamma$ , exibem capacidade citotóxica e controle do parasitismo.<sup>36-40</sup>

No que se refere à resposta imune específica, as DCs através da produção de IL-12 instruem a resposta para um padrão Th1. Esse padrão de resposta leva a liberação de IFN- $\gamma$  que além de ativar macrófagos, induzem plasmócitos a produzirem anticorpos opsonizantes e fixadores do sistema complemento, ao mesmo tempo em que ativam as células CD8 a destruírem células infectadas contendo amastigotas do *T. cruzi*. As células CD8 ativadas além de participarem da lise da célula infectada constituem uma importante fonte alternativa de IFN- $\gamma$ .<sup>37,38,41-46</sup>

Ainda em relação à resposta imune específica, outros estudos têm mostrado uma importante participação das células Th17, uma vez que a IL-17A, a principal citocina produzida por essa subpopulação, é extremamente importante para a ativação dos mecanismos de resposta imune envolvidos na destruição do parasita, como a estimulação de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e a ativação de neutrófilos.<sup>47</sup>

No entanto, todos os mecanismos citados apesar de serem considerados determinantes na resistência do hospedeiro, ao mesmo tempo podem estar intimamente relacionados com a patogênese da doença. Sugere-se que um fino controle dos mesmos deva acontecer para que as respostas não se intensifiquem ou não se perpetuem e conseqüentemente resultem em proteção em vez de lesão tecidual. Acredita-se que falhas nesse processo de regulação estejam associadas às formas sintomáticas da doença. Assim, considera-se que enquanto as formas sintomáticas da doença, particularmente a cardíaca, estão associadas à predominância de um perfil inflamatório de resposta, a indeterminada está associada a um perfil de resposta predominantemente anti-inflamatório.<sup>48</sup> Este perfil estaria vinculado, entre outros fatores, a uma maior capacidade desses indivíduos produzirem citocinas supressoras como a IL-10 que pode ser produzida por vários tipos celulares como monócitos/ macrófagos, linfócitos Th2 e

células Tregs. A atuação dessa citocina seria balanceada, no sentido de não levar a uma supressão total da resposta efetora que elimina o parasita, uma vez que estudos claramente demonstraram que a suscetibilidade a infecção pelo *T. cruzi* está relacionada com a alta produção dessa citocina e de outras anti-inflamatórias como IL-4 e TGF- $\beta$ , as quais inibem os efeitos do IFN- $\gamma$  e a subsequente ativação do macrófago.<sup>49-51</sup>

No entanto, ao mesmo tempo, deve exercer um controle sobre essa resposta no sentido de não permitir que ela seja excessiva e cause lesão tecidual. Os estudos têm cada vez mais confirmado essa ideia. Altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  têm sido associados a danos teciduais e gravidade da doença crônica.<sup>52-54</sup> Linfócitos de pacientes cardíacos produzem grandes quantidades de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6, e produção baixa ou ausente de IL-4 ou IL-10 quando comparados aos dos indivíduos assintomáticos.<sup>55,56</sup> Os níveis de TNF- $\alpha$  e NO no soro foram maiores em pacientes com a forma cardíaca grave da doença, em relação aos com a forma cardíaca leve e indeterminada.<sup>57</sup> Ainda nesses pacientes, a ausência de eventos regulatórios pode causar dano tecidual devido a uma forte resposta citotóxica de células CD8 mediada pela liberação de moléculas citotóxicas como granzimas e citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ .<sup>58</sup> Outros estudos têm mostrado que nos pacientes com a forma cardíaca ocorre um seletivo acúmulo de células Th1 devido a um perfil de quimiocinas e receptores para quimiocinas expressos pelas células do infiltrado cardíaco, que favorecem um acúmulo dessas células.<sup>53,59-63</sup> Análises imunohistoquímicas do tecido cardíaco, obtidas durante autópsias de pacientes com cardiopatia chagásica crônica grave, detectaram a presença de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .<sup>58,64</sup>

Pacientes indeterminados possuem uma grande quantidade de células CD8 e CD4 que não expressam a molécula co-estimulatória CD28 e sim a molécula CTLA-4 a qual reconhece os mesmos ligantes de CD28 nas células apresentadoras de antígeno, mas que ao invés de conduzir a ativação de células T, leva a uma modulação da resposta. A presença das células

CD4 e CD8 CTLA-4+ correlacionou-se positivamente com a produção de IL-10 por esses pacientes.<sup>65-67</sup>

Um mecanismo natural de controle da resposta imune ocorre através das denominadas células T regulatórias (Tregs).<sup>68</sup> As Tregs são subtipos de linfócitos CD4 que apresentam CD25<sup>+</sup> e o fator de transcrição FoxP3.<sup>69</sup> Esse subtipo celular modula a resposta imune, controlando a inflamação e dano tecidual através da supressão de linfócitos CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> efetores e de células T autoreativas.<sup>68,70</sup> Durante a infecção experimental e humana pelo *T. cruzi*, alguns estudos demonstram que células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> desempenham um papel regulatório.<sup>71</sup> No sangue periférico de pacientes chagásicos com a forma indeterminada da doença, existe um aumento da frequência de células T regulatórias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FoxP3<sup>+</sup>.<sup>72,73</sup> Essas células são capazes de migrar para o tecido cardíaco inflamado e suprimir a ação efetora das células CD4 e CD8.<sup>70,74-76</sup>

Outro mecanismo de controle do desenvolvimento da miocardite tem sido atribuído a Th17. Essas células, como citado anteriormente, apesar de participarem de uma resposta efetora protetora durante a infecção pelo *T. cruzi* que culmina na destruição do parasita, também estão envolvidas nos mecanismos de regulação dessas respostas, o que também pode levar a proteção.<sup>77</sup> Essas células inibem a resposta inflamatória no miocárdio induzida por Th1 sendo essa capacidade associada à atração por essas células de neutrófilos produtores de IL-10.<sup>78</sup> Estudos recentes tem demonstrado que a alta produção de IL-10 ou IL-17 correlaciona-se com uma função cardíaca melhor em pacientes chagásicos enfatizando o papel protetor dessas citocinas.<sup>79-81</sup>

Quanto à forma digestiva, a morbidade se caracteriza por aparecimento de megaesôfago e megacólon devido ao alargamento do lúmen muscular e hipertrofia dos respectivos órgãos envolvidos. São encontradas infiltrações celulares e fibrose das células musculares e do sistema nervoso intramural. Na fase aguda a alta carga parasitária pode ser a

responsável pelas lesões neurais; já na fase crônica apesar da carga parasitária estar diminuída, observa-se um intenso processo inflamatório, caracterizado pela presença de linfócitos CD4, linfócitos B, células NK e macrófagos responsável pela persistência da lesão que resulta na deservação do intestino ou esôfago, levando à morbidade dessa forma da doença.<sup>82-85</sup>

### ***Doença de Chagas e Receptores Toll-like***

Dentre os principais fatores que determinam o padrão de citocinas que será liberado em resposta a um microrganismo estão os PRRS (receptores de reconhecimento padrão).<sup>86</sup> Esses receptores reconhecem estruturas altamente conservadas nos microrganismos que são denominadas PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). Dentre estas estruturas estão lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos e inúmeras proteínas derivadas de bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos.<sup>87</sup> Após esse reconhecimento, os PRRS induzem respostas inflamatórias que caracterizam a resposta imune inata, mas também sinalizam para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Dentre os vários PRRs, se destacam os receptores semelhantes à Toll (TLRs) que são uma família de proteínas transmembrana, evolutivamente conservadas entre insetos e humanos que foram primeiramente identificados como moléculas determinantes para o padrão embriogênico em *Drosophila*.<sup>88</sup>

A expressão dos TLRs na superfície celular pode ser detectada principalmente em monócitos e DCs imaturas utilizando-se anticorpos monoclonais.<sup>89</sup> Entretanto, esses receptores podem também ser expressos por outras células, como neutrófilos, células endoteliais vasculares, adipócitos, miócitos cardíacos e células epiteliais intestinais. A expressão de vários TLRs é também modulada em resposta a diferentes estímulos.<sup>90</sup>

A família dos TLRs é composta por 11 a 13 membros expressos em células de mamíferos e camundongos e são agrupados de acordo com os PAMPs que reconhecem. Os

TLRs apresentam uma porção extracelular com motivos repetidos ricos em leucina e um domínio citoplasmático homólogo ao receptor de IL-1 conhecido como domínio TLR/IL-1R(TIR).<sup>91-95</sup> Esses receptores sinalizam através de moléculas adaptadoras citoplasmáticas como MyD88 , TRIF, TIRAP(Mal) e TRAM que também apresentam um domínio TIR. A molécula adaptadora MyD88 é essencial para sinalização de todos os TLRs, exceto o TLR3, através da ativação do fator de transcrição NF-κB e proteínas kinase de atividade mitogênica (MAPKs), responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias.<sup>96</sup>

Diversas moléculas do *T. cruzi* têm sido identificadas como PAMPs para os TLRs. Os principais são os glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) encontrados em grandes quantidades na superfície dos tripanosomatídeos, inclusive *T. cruzi*, e que tem a função de ancorar glicoproteínas e lipopolissacarídeos. Alguns estudos têm mostrado que GPIs derivadas de tripomastigotas (tGPIs) são reconhecidas pelo TLR2.<sup>97-99</sup> Um outro membro da família GPI, purificada das formas epimastigotas (eGPIs) induzem ativação da via NF-κ B via TLR4.<sup>100</sup>

Vários estudos têm objetivado avaliar a importância dos sinais dados pela ligação dos PAMPs do *T. cruzi* aos TLRs, sobre o desenvolvimento de suscetibilidade ou resistência do hospedeiro a infecção. A maioria dos trabalhos utilizou camundongos nocautes para um ou mais desses receptores e de uma forma global, os resultados mostraram que o TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9 são importantes para os mecanismos de resistência a infecção pelo *T. cruzi*. Adicionalmente, os estudos mostraram que a importância desses receptores está vinculada a modulação tanto da resposta imune inata como da adaptativa. Os estudos também deixaram claro que existe certo grau de redundância na ação dos diferentes TLRs, o que significa que embora cada um dos receptores tenham a sua participação individual , a ausência concomitante de múltiplos TLRs é que determinará um alto grau de suscetibilidade a infecção, levando-se em consideração que o *T.cruzi* tem vários ligantes para os diferentes TLRs.<sup>87</sup>

A primeira comprovação da importância dos TLRs nos mecanismos de resistência ao *T. cruzi* foi feita em camundongos nocautes para a molécula adaptadora MyD88, essencial para sinalização de quase todos os TLRs. Esses camundongos, quando infectados com tripomastigotas, apresentaram alta parasitemia e mortalidade que estiveram associadas a uma baixa produção de IFN- $\gamma$  e IL-12.<sup>101,102</sup> Adicionalmente, camundongos nocautes para TLR2 e TLR9 apresentaram suscetibilidade aumentada à infecção pelo *T. cruzi* associada com uma baixa resposta Th1.<sup>103</sup> Da mesma forma, a resposta inflamatória induzida pela ligação de GIPL a TLR4 é caracterizada pela produção de uma resposta protetora baseada na produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e NO. Ao contrário, camundongos TLR4<sup>-/-</sup> apresentaram intensa parasitemia, o que confirma o papel do TLR4 na resistência a infecção com *T. cruzi*.<sup>104,105</sup>

## **JUSTIFICATIVA**

Apesar de todos os trabalhos citados acima, não existem estudos que tenham objetivado, de uma forma sistemática, avaliar o papel dos TLRs, na indução dos diferentes perfis de citocinas produzidos por indivíduos sintomáticos e assintomáticos na Doença de Chagas. Assim, no presente trabalho, hipotetizamos que os pacientes com as formas sintomáticas da doença liberariam um perfil de citocinas mais inflamatório, enquanto que os assintomáticos mais anti-inflamatório, e que essas diferenças poderiam estar associadas em cada grupo de indivíduos a uma maior expressão e ou ativação dos TLRs envolvidos na indução desses diferentes perfis.

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo Geral***

Avaliar o papel do TLR2 e TLR4 na indução do perfil de citocinas liberado por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas indeterminada, cardíaca e digestiva da doença de Chagas.

### ***Objetivos Específicos***

- Avaliar a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas indeterminada, cardíaca e digestiva da doença de Chagas, através da técnica de citometria de fluxo.
- Avaliar a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 e TGF- $\beta$  utilizando a técnica de CBA, em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com as formas indeterminada, cardíaca e digestiva da doença de Chagas, após estimulação com agonistas do TLR2 e TLR4.

## CASUÍSTICA

Foram avaliados 44 pacientes com doença de Chagas, sendo 16 na forma digestiva, 13 na forma cardíaca e 15 com a forma indeterminada, maiores de 18 anos, sendo 23 do sexo masculino e 21 do sexo feminino, ambos do Ambulatório de Moléstias Infecciosas Geral, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Esses pacientes foram encaminhados pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, quando no momento da doação de sangue, tiveram pelo menos um teste sorológico positivo (ELISA, RIFI, HAI) para doença de Chagas. Quando começaram o acompanhamento, foram realizados mais 3 testes sorológicos de diferentes princípios: ELISA/Quimioluminescência, HAI e RIFI, e foram considerados indivíduos chagásicos crônicos os que apresentaram pelo menos 2 desses testes positivos. Também foram avaliados 16 indivíduos controles, que realizaram exame para doença de Chagas e foram negativos. Todos os indivíduos controles eram doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. O consentimento dos indivíduos para participação no presente trabalho foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. “Projeto de Pesquisa aprovado em reunião do CEP de 01/04/2013, sem necessidade de envio à CONEP”. Resolução MS/CNS 196/96,

## MÉTODOS

### *Formação dos grupos de estudo*

Os grupos foram divididos em:

**G1:** pacientes chagásicos crônicos na forma indeterminada

**G2:** pacientes chagásicos crônicos na forma cardíaca.

**G3:** pacientes chagásicos crônicos na forma digestiva.

**G4:** indivíduos doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, com sorologia negativa para DC, de mesmo sexo e faixa etária dos pacientes com doença de Chagas, e sem antecedentes epidemiológicos para a DC.

### *Crítérios de inclusão*

No G1 foram incluídos os indivíduos que apresentaram pelo menos 2 testes sorológicos de diferentes princípios positivos para DC, ausência de alterações no eletrocardiograma convencional, ausência de alterações radiológicas, no tórax (raio-x de tórax), esôfago (esôfago-estômago-duodeno) e cólon (enema opaco).

Foram incluídos nos grupos G2 e G3 os indivíduos que apresentaram sorologia positiva em pelo menos 2 testes sorológicos de diferentes princípios para DC. As formas clínicas foram classificadas e diferenciadas após avaliação dos pacientes com alterações em eletrocardiograma convencional, alterações radiológicas no esôfago (esôfago-estômago-duodeno), cólon (enema opaco), tórax (raio-x de tórax).

Os pacientes incluídos no estudo estavam na faixa etária entre 30 a 70 anos.

### ***Critérios de exclusão***

Foram utilizados como critérios de exclusão do estudo:

- ❖ Mulheres em período gestacional;
- ❖ Indivíduos que apresentavam doenças granulomatosas;
- ❖ Outras doenças infecciosas concomitantemente a doença de Chagas;
- ❖ Pacientes submetidos à quimioterapia, corticoterapia ou outro esquema de imunossupressão.

A análise prévia para exclusão desses pacientes foi realizada pelo Médico Infectologista responsável pelo acompanhamento dos pacientes no Ambulatório de Moléstias Infecciosas Geral da Faculdade de Medicina de Botucatu.

### ***Coleta de sangue***

As amostras foram obtidas a partir da coleta de sangue venoso seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso, e foram utilizados materiais estéreis e descartáveis. Pela determinação da RDC 302/205, as amostras de sangue colhidas foram armazenadas em recipiente isotérmico (isopor), higienizável, impermeável e com gelo.

Foram obtidos 20 ml de sangue por punção venosa no antebraço, em um único momento de indivíduos dos grupos G1, G2, G3 e G4.

### ***Obtenção de células mononucleares totais do sangue periférico***

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O anel rico em linfócitos e monócitos foi lavado inicialmente, com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich,) por 15 minutos a 1500 rpm. Após esse período, as células foram ressuspensas com meio de cultura

RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina, 40 ug/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich,) e 10% de soro bovino fetal (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC), sendo a identificação e viabilidade das mesmas realizadas através de contagem com Turk (alíquotas de 50µl da suspensão celular em 50 µl da solução de Turk a 5%). A seguir, a concentração de células totais foi acertada para  $1 \times 10^6$  células/ml para a realização dos protocolos.

#### ***Cultura de células mononucleares do sangue periférico com agonistas de TLR2 e TLR4***

As células mononucleares totais ( $1 \times 10^6$ /ml) obtidas conforme o item anterior, foram incubadas a 37°C, em tensão de 5% CO<sub>2</sub>, na ausência ou presença de peptídeoglicanos do *Staphylococcus aureus* (PGN do *S. aureus*) (5µg/ml), agonista de TLR2 ou de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* ultra purificado (LPS de *E. coli* K12) (1µg/ml), agonista de TLR4, ambos da InvivoGen(San Diego, CA, USA). Após 24 horas de incubação, os sobrenadantes foram aspirados, sendo as alíquotas deste material conservadas a -80°C até o momento de sua utilização para dosagem das citocinas.

#### ***Determinação da produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares totais do sangue periférico***

As dosagens das citocinas TNF-α, IFN- γ, IL-17, TGF- β e IL-10 foram realizadas pela técnica de CBA(Citometric Beads Array), utilizando kits comerciais (BD-Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ,USA) e de acordo com as indicações do fabricante.

#### ***Avaliação da expressão de TLR2 e TLR4 na superfície de células mononucleares do sangue periférico por citometria de fluxo***

Suspensões de células mononucleares obtidas conforme descrito anteriormente, foram colocadas em tubos Falcon para citômetro (BD-Becton, Dickinson and Company), na

concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml e centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células foram incubadas no escuro com anticorpo monoclonal anti-CD3 conjugado com PE-DY647 (EXBIO Vestec, República Tcheca), anti-CD14 conjugado com PE-DY647 (EXBIO), anti-TLR-4 conjugado com FITC (Biolegend, San Diego, CA, EUA) e anti-TLR-2 conjugado com PE (Biolegend) durante 15 minutos. Após a incubação, as células foram ressuspensas em 500 µl de solução eletrolítica ISOTON II (BD-Becton, Dickinson and Company) e fixadas com 50 µl de solução de fixação contendo 5% de formaldeído (BD- Becton, Dickinson and Company). Para cada teste houve um tubo controle no qual as células foram incubadas com anticorpos controles isotípicos marcados com os respectivos fluorocromos dos testes. As células foram analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCALIBUR™ (BD-Becton, Dickinson and Company) usando o programa “Cell Quest” (BD-Becton, Dickinson and Company) para aquisição e análise celular.

### ***Análise Estatística***

A análise estatística foi realizada com o auxílio do *GraphPad Prism Version 5.01* para Windows, *GraphPad Software, Inc.*, (San Diego, California - USA). Diferenças significativas entre os diversos grupos para a análise da porcentagem de células que expressam TLR2 ou TLR4 e a média de intensidade de fluorescência foram determinadas pelo teste de Análise de Variância para amostras independentes, e as médias comparadas pelo teste de Correlações Múltiplas de *Tukey-Kramer*, Para os resultados de produção de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-10 e TGF- $\beta$  foi realizado teste t- não paramétrico e as medianas comparadas pelo teste de *Kruskal Wallis*. Para todas as análises foi assumida como verdadeira cada hipótese em que a probabilidade de erro fosse menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

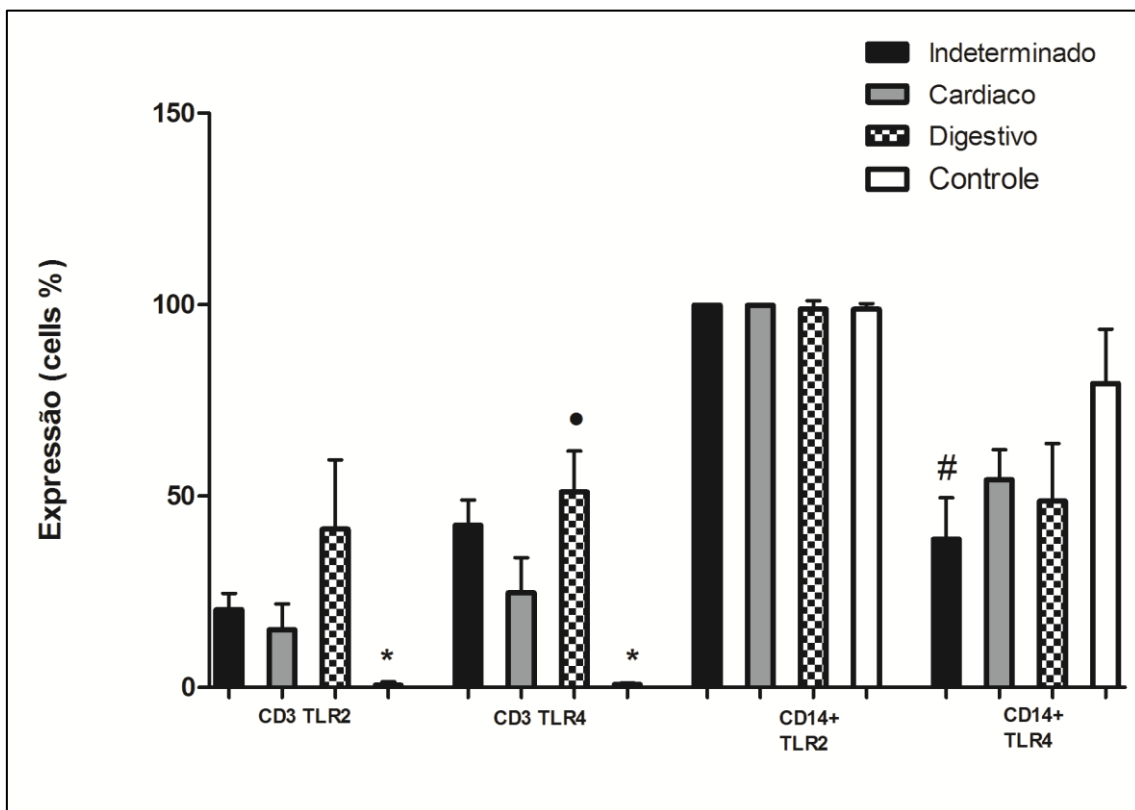
### *Avaliação da expressão dos receptores TLR2 e TLR4 por monócitos e linfócitos*

Inicialmente, foram avaliadas as porcentagens de linfócitos (CD3<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>) de indivíduos controles e pacientes com as formas indeterminada, cardíaca e digestiva que expressam TLR2 e TLR4. Detectamos que as porcentagens de células CD3<sup>+</sup> expressando TLR2 e TLR4 foi significativamente maior nos 3 grupos de pacientes em relação aos indivíduos controle.

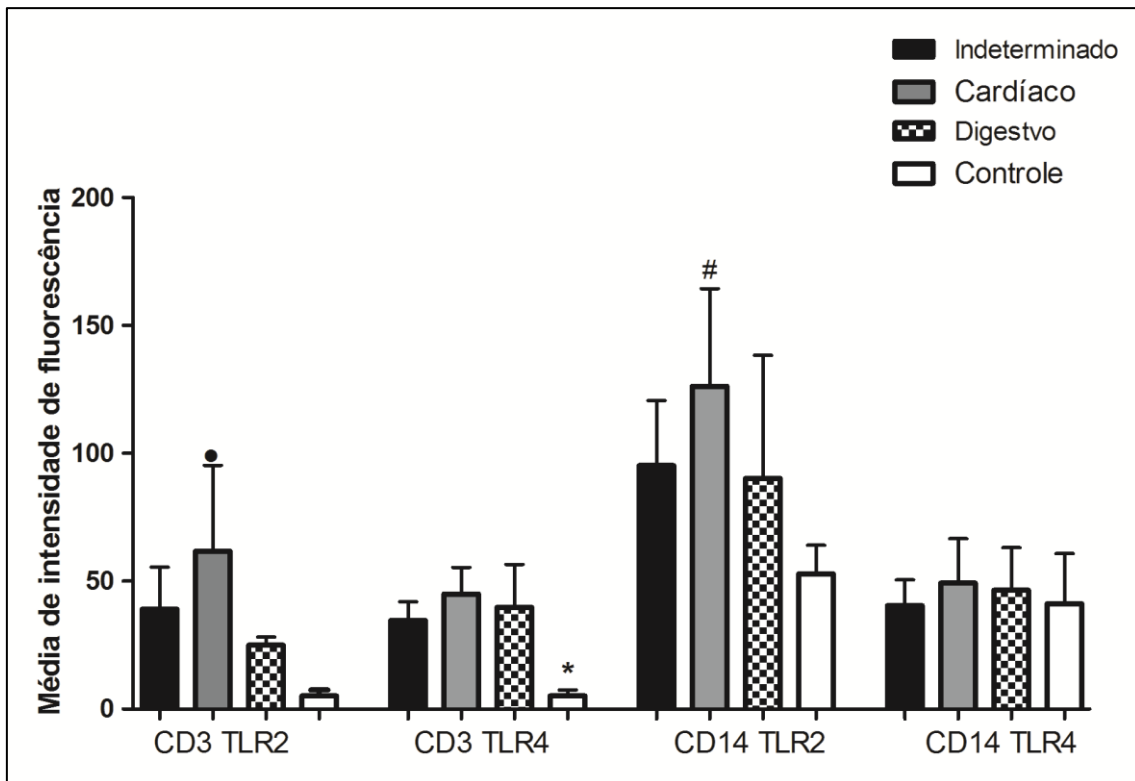
Além disso, pacientes com a forma digestiva apresentaram maior porcentagem de células CD3<sup>+</sup> expressando TLR4 em relação aos pacientes cardíacos. Em relação ao CD14<sup>+</sup>, houve uma tendência das células dos 3 grupos de pacientes apresentarem uma diminuição da expressão de TLR4 em relação às células dos controles, sendo essa diferença significativa no grupo de indivíduos com a forma indeterminada. (Figura 1).

A expressão desses receptores também foi avaliada pela média de intensidade de fluorescência (MIF). A MIF relacionada à TLR2 em células CD3<sup>+</sup> de pacientes cardíacos foi significativamente maior quando comparada com a de pacientes com a forma digestiva. Pacientes com a forma indeterminada, cardíaca e digestiva apresentaram uma maior intensidade de fluorescência de TLR4 em CD3<sup>+</sup> quando comparados com indivíduos controles. A intensidade de fluorescência relacionada à TLR2 em células CD14<sup>+</sup> também foi maior em pacientes cardíacos quando comparada com a dos indeterminados, digestivos e indivíduos controles (Figuras 2 e 3). De uma forma global, a análise dos resultados dos dois ensaios (porcentagem de células expressando os receptores e intensidade de fluorescência) permitem sugerir que houve uma tendência dos pacientes com as formas cardíaca e digestiva apresentarem uma maior expressão de TLR2 nas células CD3<sup>+</sup> em relação aos indivíduos controles. Os indivíduos com a forma digestiva apresentaram ainda uma maior expressão de

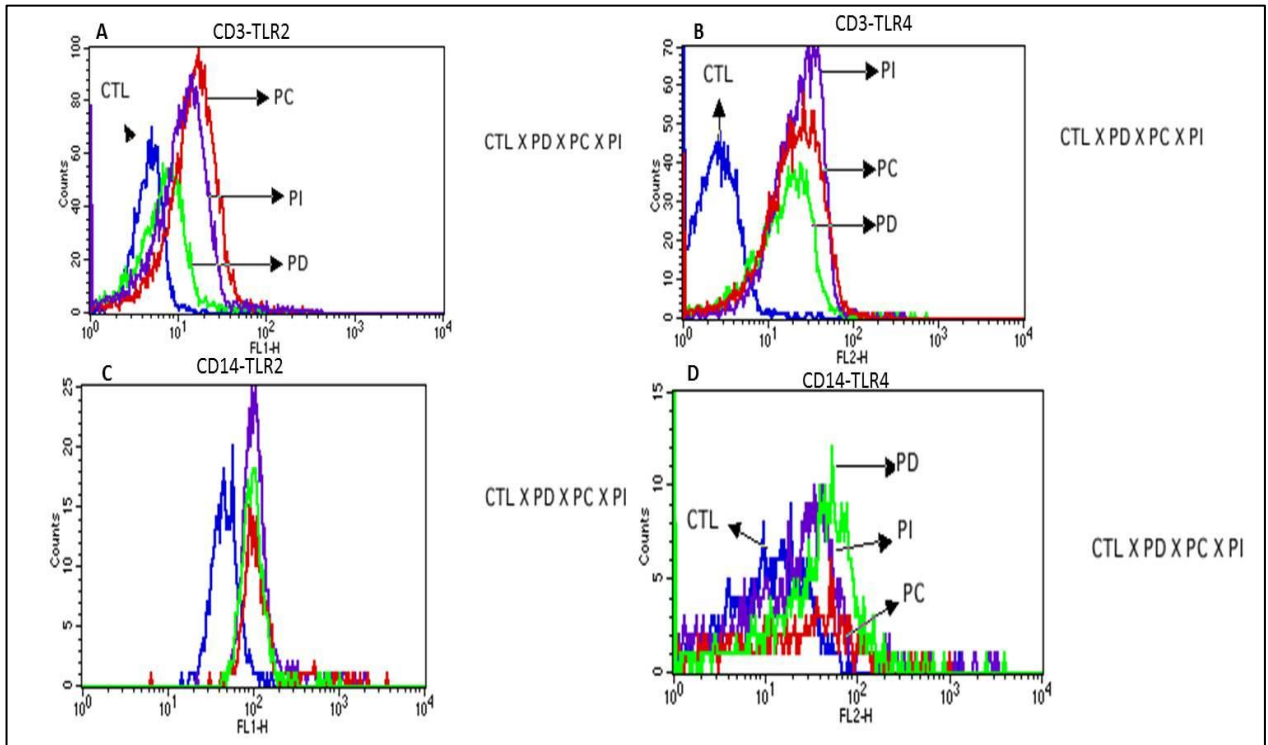
células CD3<sup>+</sup> expressando TLR4. As células CD14<sup>+</sup> dos pacientes com a forma cardíaca ainda apresentaram uma maior expressão de TLR2 em relação aos demais grupos, determinada principalmente pela MIF. Em relação ao TLR4, os pacientes com a forma indeterminada apresentaram uma diminuição da sua expressão.



**Figura 1.** Média da porcentagem de células CD3<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup> expressando TLR2 e TLR4 de pacientes chagásicos crônicos com as formas indeterminada, cardíaca, digestiva e indivíduos controles. Estratégia de gating foi utilizada para distinguir entre as populações celulares analisadas por citometria de fluxo. Perfis FSC-SSC foram utilizados para distinguir monócitos e linfócitos totais. Os resultados são representados em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  x indeterminados, cardíacos e digestivos. • $p < 0,05$  x pacientes cardíacos. #  $p < 0,05$  x indivíduos controle.



**Figura 2.** Expressão de TLR2 e TLR4 avaliada pela média de intensidade de fluorescência (MIF) em células CD3<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup> de pacientes chagásicos crônicos com as formas, indeterminada, cardíaca, digestiva e indivíduos controles. Os resultados são representados em média  $\pm$  desvio padrão.\*  $p < 0,05$  x pacientes indeterminados, cardíacos e digestivos. •  $p < 0,05$  x pacientes digestivos, #  $p < 0,05$  x pacientes indeterminados, digestivos e indivíduos controle.



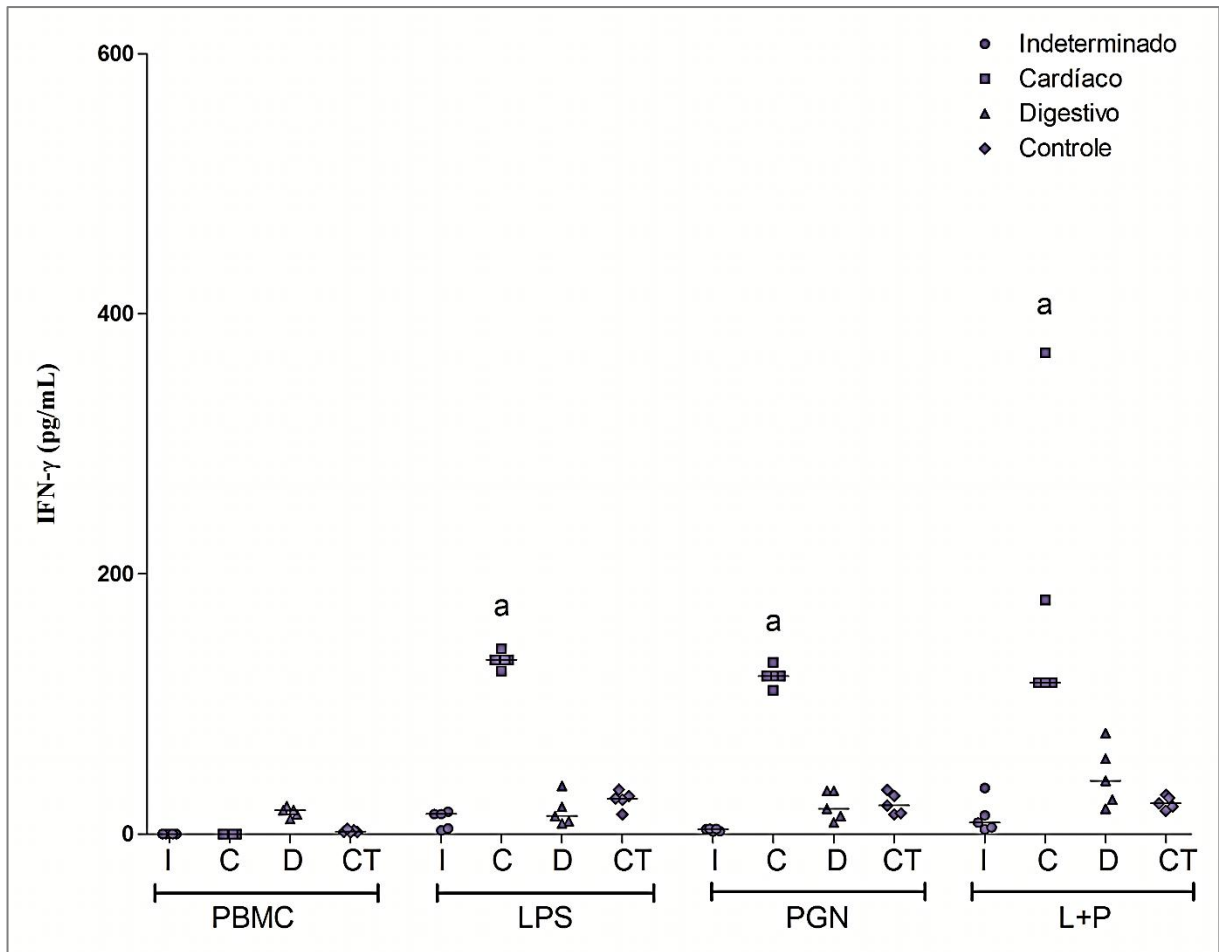
**Figura 3.** Histogramas representativos dos resultados da expressão de TLR2 em linfócitos  $CD3^+$  (A), TLR4 em  $CD3^+$  (B) TLR2 em monócitos  $CD14^+$  (C), TLR4 em  $CD14^+$  (D), em pacientes indeterminados (PI), cardíacos (PC), digestivos (PD) e indivíduos controles (CT) avaliada pela média da intensidade de fluorescência.

***Participação dos TLR2 e TLR4 na produção de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-10 e TGF- $\beta$***

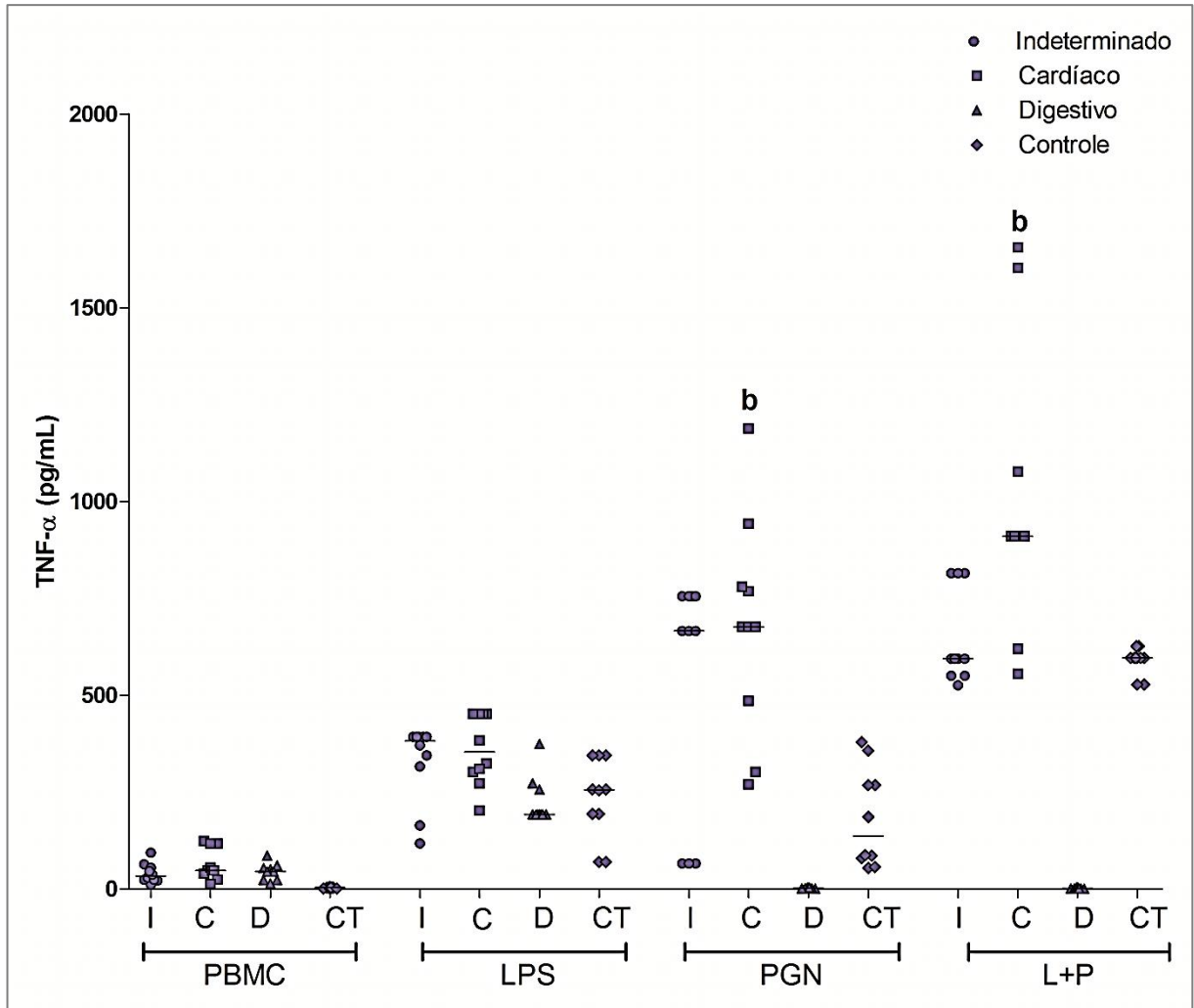
Após analisarmos a expressão dos receptores nos 3 grupos de pacientes e indivíduos controles avaliamos a participação dos mesmos na produção de citocinas, após estímulo das células mononucleares com os respectivos agonistas desses receptores TLR2 (PGN) e TLR4 (LPS) (Figura 4).

Células de pacientes com a forma cardíaca, quando comparadas com indeterminados, da forma digestiva e indivíduos saudáveis produziram níveis significativamente maiores de IFN- $\gamma$  quando estimulados com LPS, PGN e LPS+PGN (Figura 4), mostrando que nesses indivíduos a estimulação tanto dos receptores TLR2 como TLR4 leva a uma maior produção da citocina quando comparado aos demais grupos. Quanto à produção de TNF- $\alpha$ , não foram detectadas diferenças importantes entre os grupos quando as células foram ativadas com LPS. No entanto, após estimulação com PGN e LPS+PGN, chama a atenção mais uma vez que pacientes com a forma cardíaca produzem níveis significativamente maiores da citocina, em relação aos demais grupos (Figura 5).

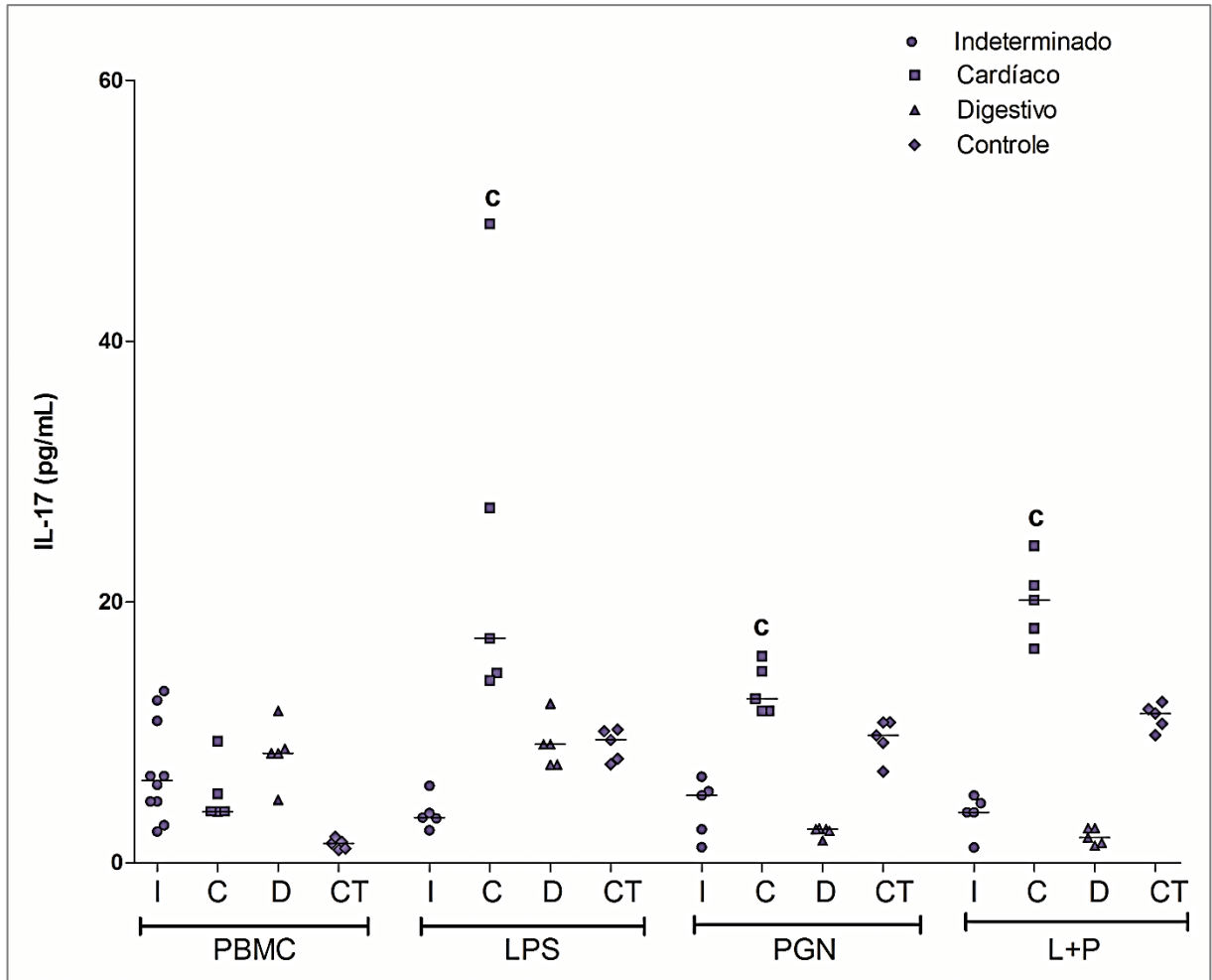
Quanto a IL-17, chama atenção novamente que células mononucleares de pacientes cardíacos liberam níveis significativamente maiores desta citocina quando estimulados com LPS, PGN e LPS+PGN, em relação aos pacientes indeterminados, digestivos e indivíduos controle (Figura 6). Resultados diferentes, no entanto, foram detectados em relação à produção de IL-10 (Figura 7) e TGF- $\beta$  (Figura 8) uma vez que após estimulação com LPS, PGN e LPS+PGN houve uma maior produção pelas células dos indivíduos com a forma indeterminada em relação aos demais grupos.



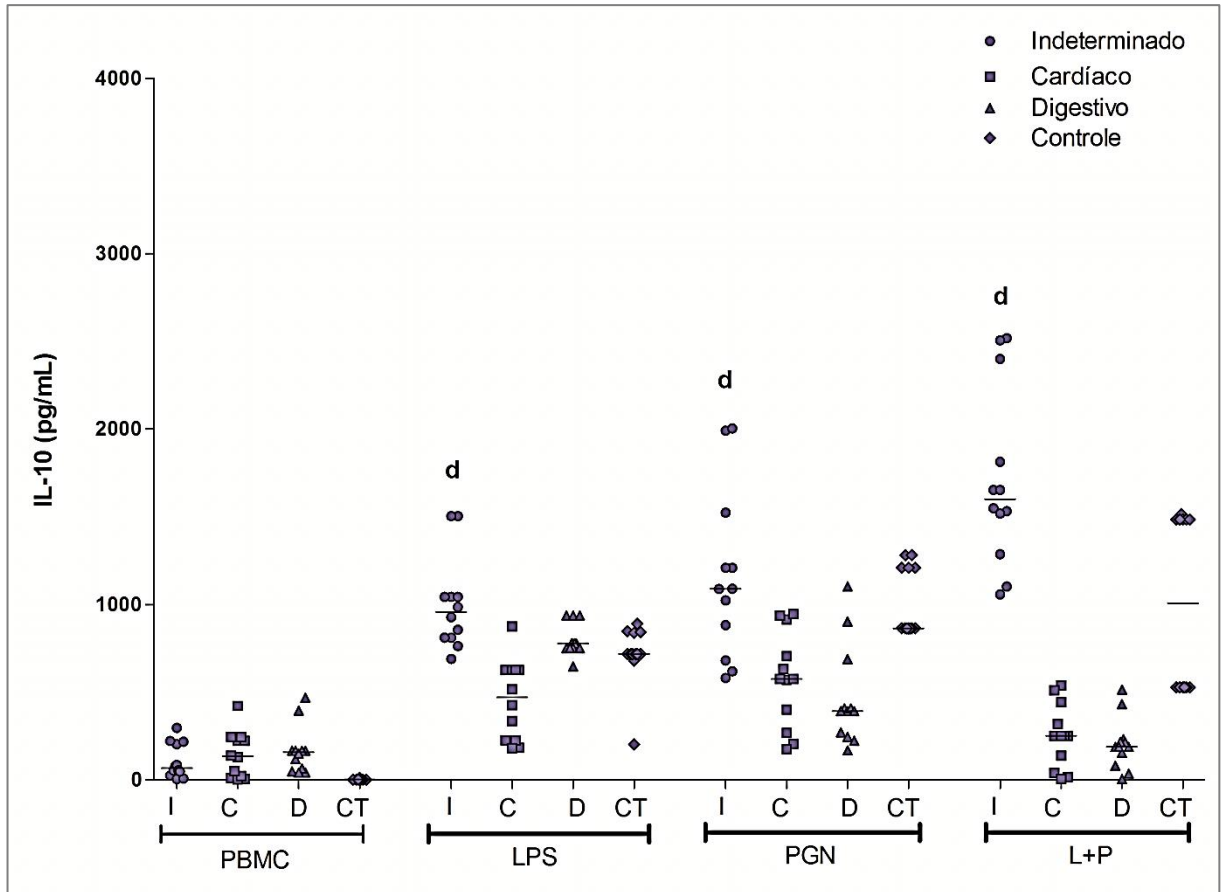
**Figura 4.** Produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares de pacientes chagásicos crônicos com as formas indeterminada, cardíaca, digestiva e indivíduos controles, após o estímulo com LPS (agonista do TLR4) PGN (agonista do TLR2) e LPS+PGN. Os resultados são expressos em mediana. Letras representam diferenças significativas entre os 4 grupos para cada estímulo.



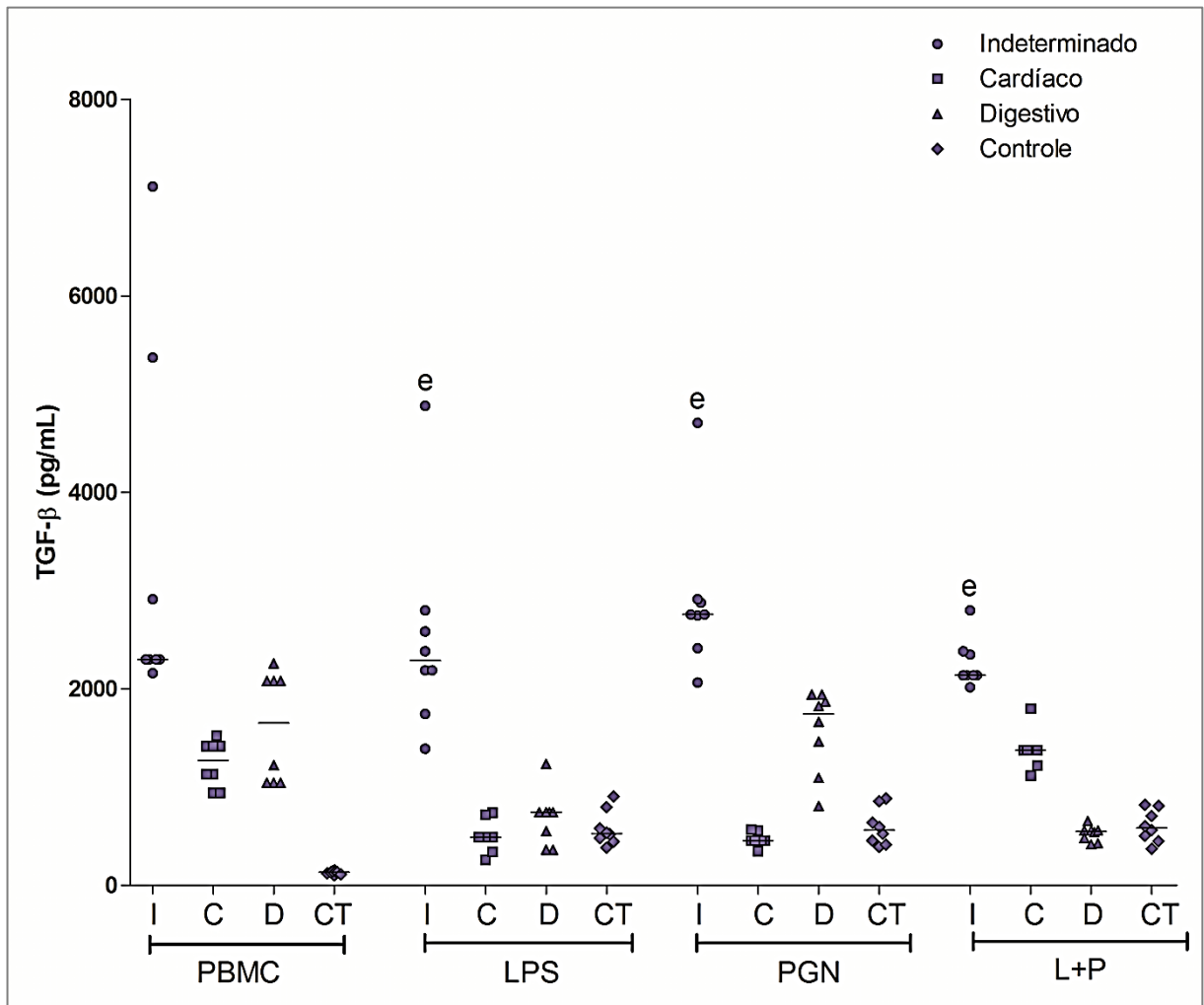
**Figura 5.** Produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares de pacientes chagásicos crônicos com as formas indeterminada, cardíaca, digestiva e indivíduos controles, após o estímulo com LPS (agonista do TLR4) PGN (agonista do TLR2) e LPS+PGN. Os resultados são expressos em mediana. Letras representam diferenças significativas entre os 4 grupos para cada estímulo.



**Figura 6.** Produção de IL-17 por células mononucleares de pacientes chagásicos crônicos com as formas indeterminada, cardíaca, digestiva e indivíduos controles, após o estímulo com LPS (agonista do TLR4) PGN (agonista do TLR2) e LPS e PGN. Os resultados são expressos em mediana. Letras representam diferenças significativas entre os 4 grupos para cada estímulo.



**Figura 7.** Produção de IL-10 por células mononucleares de pacientes chagásicos crônicos com as formas indeterminada, cardíaca, digestiva e indivíduos controles, após o estímulo com LPS (agonista do receptor TLR4) PGN (agonista do TLR2) e LPS+PGN. Os resultados são expressos em mediana. Letras representam diferenças significativas entre os 4 grupos para cada estímulo.



**Figura 8.** Produção de TGF- $\beta$  por células mononucleares de pacientes chagásicos crônicos com as formas indeterminada, cardíaca, digestiva e indivíduos controles, após o estímulo com LPS (agonista do receptor TLR4) PGN (agonista do TLR2) e LPS+PGN. Os resultados são expressos em mediana. Letras representam diferenças significativas entre os 4 grupos para cada estímulo.

## DISCUSSÃO

No presente trabalho hipotetizamos que os pacientes com as formas sintomáticas da doença liberam um perfil de citocinas mais inflamatório, enquanto que os assintomáticos mais anti-inflamatório, e que essas diferenças poderiam estar associadas, em cada grupo de indivíduos, a uma maior expressão e ou ativação de TLR2 e ou TLR4, dois dos principais PRRS envolvidos no reconhecimento de PAMPs do *T.cruzi*.<sup>97-100</sup>

A abordagem experimental foi avaliar se há uma expressão diferencial desses receptores nos dois grupos de pacientes, assim como analisar a capacidade de produção dessas citocinas em cada grupo de pacientes, após estimulação das células mononucleares com agonistas desses receptores.

Como esperado, quando analisamos a produção de citocinas pelos 3 grupos, detectamos que pacientes com a forma cardíaca liberam preferencialmente IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 enquanto os com a forma indeterminada liberam preferencialmente IL-10 e TGF- $\beta$ . Assim, já nessa análise inicial, mesmo sem avaliar a participação dos receptores propostos, nossos resultados confirmam a nossa hipótese no sentido de que pacientes sintomáticos, particularmente os com a forma cardíaca, liberam um perfil de citocinas pró-inflamatório em contraste com os indeterminados que mostram um perfil predominantemente anti-inflamatório. Esses resultados encontram suporte na literatura. Estudos recentes mostraram que pacientes chagásicos cardíacos apresentaram uma forte resposta imunológica expressa por altos níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 quando comparados com pacientes indeterminados e indivíduos não infectados. Ao contrário, pacientes com a forma indeterminada da doença, apresentaram altos níveis de IL-10 quando comparados com pacientes cardíacos e indivíduos não infectados<sup>106</sup>. Da mesma forma, outro estudo mostrou que o infiltrado inflamatório dos pacientes com miocardite é responsável pela grande produção de IFN- $\gamma$  detectado na periferia

<sup>107</sup>. Corroborando esses achados os estudos têm mostrado que na forma cardíaca ocorre um seletivo acúmulo de células Th1 no miocárdio devido a perfil de quimiocinas e receptores para quimiocinas expressos pelas células do infiltrado nesse local, que favorecem esse processo.<sup>53,59-63</sup> Ainda nos pacientes com miocardite, além da presença de células Th1, foi identificado um grande número de células CD8<sup>+</sup> produtoras de moléculas citotóxicas, incluindo o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , mas um número reduzido de células secretando IL-10 e de células T regulatórias FOXP3<sup>+</sup>.<sup>55,72,108,109</sup> Ao contrário, nos pacientes com a forma indeterminada foram detectados altos níveis de IL-10 devido a uma alta porcentagem de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>. As Tregs, além da IL-10 também podem produzir TGF- $\beta$ .<sup>110</sup> Além das Tregs, uma outra fonte importante de citocinas anti-inflamatórias são os monócitos /macrófagos. Nesse sentido, monócitos de pacientes indeterminados produzem níveis maiores de IL-10 do que os pacientes cardíacos.<sup>71,111</sup>

Assim, embora não tenhamos identificado as populações de células mononucleares que liberam as citocinas testadas nos sobrenadantes, podemos sugerir que o níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  detectados foram preferencialmente produzidos por Th1, não descartando a possibilidade de participação das células CD8<sup>+</sup>, induzidas preferencialmente nos indivíduos com doença cardíaca, enquanto que a IL-10 e TGF- $\beta$  foram liberadas por monócitos e ou pelas Tregs, induzidas preferencialmente nos pacientes indeterminados.

Em relação especificamente a IL-17 liberada pelas células Th17, nossos resultados sugerem a sua participação nos mecanismos de indução de miocardite, uma vez que níveis elevados foram detectados nos pacientes com doença cardíaca, o que não concorda com os dados de literatura, que têm mostrado que essa citocina tem um papel regulador sobre o desenvolvimento da miocardite. Em um estudo experimental no qual camundongos infectados com *T. cruzi* foram tratados com anticorpo monoclonal anti-IL17A, houve um aumento da miocardite, mortalidade e uma diminuição da carga parasitária no coração, sugerindo que a

IL-17 é importante no controle do processo inflamatório responsável pela miocardite.<sup>77</sup> Outros estudos mostraram que PBMCs de pacientes chagásicos ausentes de cardiomiopatia ou com branda cardiomiopatia, liberaram altos níveis de IL-17 em células TCD4<sup>+</sup> em comparação com pacientes com severa e moderada cardiomiopatia.<sup>112</sup> O mecanismo de regulação da IL-17 envolve a inibição da diferenciação de células Th1, produção de citocinas e quimiocinas e o influxo de células inflamatórias no tecido cardíaco.<sup>77</sup> Estudos adicionais mostraram que essa regulação está associada à atração por essas células de neutrófilos produtores de IL-10.<sup>78</sup>

No presente estudo, as análises objetivando identificar o papel do TLR2 e TLR4 na indução do perfil de citocinas liberado por cada um dos grupos avaliados, mostraram que uma maior produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  em pacientes com a forma cardíaca ocorre tanto após a estimulação de TLR2 como de TLR4, enquanto que de TNF- $\alpha$  apenas após a estimulação de TLR2. Curiosamente, a estimulação dos dois receptores em células de indivíduos com a forma indeterminada levou a liberação de níveis maiores de IL-10 e TGF- $\beta$  por esses pacientes. Assim, a estimulação de um mesmo receptor pode levar tanto a produção preferencial de citocinas pró como anti-inflamatórias, na dependência do indivíduo testado.

A participação desses receptores tanto na produção de citocinas pró como anti-inflamatórias encontra suporte na literatura, uma vez que estudos têm mostrado que diferentes GPIs derivadas do *T. cruzi* são reconhecidas pelo TLR2 e ou TLR4<sup>97-100</sup>, e que os sinais dados por essa ligação têm uma importância fundamental no desenvolvimento de suscetibilidade ou resistência do hospedeiro a infecção.<sup>87,101-105</sup>

Ao estabelecermos uma correlação entre a produção de citocinas via estimulação dos receptores e a expressão dos mesmos, concluímos que uma das explicações para um perfil de resposta mais inflamatório nos pacientes com a forma cardíaca em relação aos digestivos pode ser o fato de os primeiros tenderem a expressar uma maior quantidade de receptores

TLR2, tanto em células CD3<sup>+</sup> como em células CD14<sup>+</sup>, o que não ocorreu com os pacientes digestivos nos quais os níveis maiores foram detectados somente nas células CD3<sup>+</sup>. A participação do TLR2 particularmente no desenvolvimento da doença cardíaca tem sido destacado. Estudos mostraram a participação fundamental desse receptor na emissão de sinais para a produção de IL1- $\beta$ , considerada um importante mediador da hipertrofia desencadeada em cardiomiócitos isolados de murinos infectados pelo *T. cruzi*.<sup>113</sup>

No entanto, a explicação acima não se torna coerente quando analisamos a produção de IL-10 e TGF- $\beta$ . Como os dois receptores estão envolvidos na produção dessas citocinas, os pacientes com a forma cardíaca também expressariam uma maior produção das mesmas, o que não ocorreu. No entanto, as diferenças entre as respostas dos diferentes grupos de pacientes ao estímulo do mesmo PRR, podem não estar somente ligadas a expressões diferenciais desses receptores. A ativação diferente de um mesmo TLR em indivíduos diferentes pode estar associada ao polimorfismo desses receptores e suas moléculas adaptadoras. Um estudo no qual foram avaliados 169 pacientes com cardiopatia chagásica crônica e 76 indivíduos infectados com *T. cruzi* e assintomáticos, revelou que pacientes infectados pelo *T. cruzi*, que são heterozigotos para a variante S180L MAL/TIRAP (que leva a uma diminuição no sinal de transdução após a ligação de TLR2 e TLR4 ao respectivo ligante) podem ter um menor risco de desenvolvimento de cardiopatia chagásica crônica.<sup>114</sup> Assim, estudos objetivando analisar esse polimorfismo nos pacientes e a suas consequências para o desenvolvimento das diferentes manifestações da doença devem ser estimulados.

Um resultado que merece ser discutido, é que, de início, consideramos que além dos pacientes com a forma cardíaca, os com a forma digestiva, também poderiam apresentar diferenças importantes em relação aos assintomáticos no que se refere a produção de citocinas, o que não ficou claro após a análise de nossos resultados. Consideramos que uma

análise mais aprofundada das condições clínicas de cada paciente e a sua resposta de produção de citocinas possa eventualmente alterar ou confirmar esses resultados.

## CONCLUSÃO

Em conjunto, os nossos resultados contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos de resposta imune desenvolvidos pelo hospedeiro infectado pelo *T.cruzi*, com enfoque para os envolvidos nas diferentes manifestações clínicas da doença, que ainda trata-se de um desafio importante para os estudiosos da área, que objetivam ao final sugerir interferências no sentido de modular a resposta dos pacientes e evitar uma evolução para as formas sintomáticas da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98(5):577-91.
2. Williams JT, Dick EJ, Jr., VandeBerg JL, Hubbard GB. Natural Chagas disease in four baboons. *J Med Primatol*. 2009; 38(2):107-13.
3. Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*. 1991; 31:547-57.
4. Ministério da Saúde (BR). Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2012 [acesso 31 Maio 2014]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idxt=31454](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idxt=31454).
5. Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2000; 16:7-12.
6. Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde. Chagas disease [Internet]. Washington: PAHO; 2015 [acesso 30 Jul 2015]. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743).
7. World Health Organization. Chagas Disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: WHO; 2015 [acesso 30 Jul 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/chagas/en/>.
8. Muñoz J, Gómez I, Prat J, Gállego M, Gimeno F, Treviño B, López-Chejade P et al. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop*. 2009; 111(1):51-5.
9. Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A et al. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva Switzerland. *PloS Negl Trop Dis*. 2010; 4(2):e592.
10. Albajar-Vinas P, Jannin J. The hidden Chagas disease burden in Europe. *Euro Surveill*. 2011; 16(38):pii 19975.
11. Muñoz J, Coll O, Juncosa T, Verges M, del Pino M, et al. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis* 2009; 48(12):1736-40.
12. Basile L, Oliveira I, Ciruela P. The current screening programme for congenital transmission of Chagas disease in Catalonia, Spain. *Euro Surveill*. 2011; 16(38) :pii: 19972.

13. Flores-Chávez M, Fernández B, Puente S, Torres P, Rodríguez M, Monedero C, Cruz I et al. Transfusional chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(5):e44-7.
14. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Parasites - American Tripanosomíasis (also known as Chagas Disease): Epidemiology & Risk Factors [Internet]. Atlanta: CDC; 2015 [acesso 20 Set 2015]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>.
15. Sosa-Estani S, Segura EL. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. *Curr Opin Infect Dis*. 2006; 19(6):583-7.
16. Botoni FA, Ribeiro ALP, Marinho CC, Lima MMO, Nunes MCP, Rocha MOC. Treatment of Chagas Cardiomyopathy. *Biomed Res Int*. 2013;2013:849504. doi: 10.1155/2013/849504. Epub 2013 Nov 24.
17. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e29.
18. Brener Z, Tarleton R. Parasite persistence in actiology of Chagas diseases. *Int J Parasitol*. 2001;31:550-4.
19. Rassi, A, Jr, Rassi, A, Marin-Neto, J.A. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375(9723):1388-402.
20. Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis Db, et al. Celular and genetical mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 Suppl 1 :208-18.
21. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current Understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol*. 2012; 34(6):753-70.
22. Nunes MC, Reis RC, Colosimo EA, et al. Risk estimation approach in Chagas disease is still needed. *Int J Cardiol*. 2011; 147:294-6.
23. Rassi A Jr., Rassi A, Rassi SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation*. 2007; 115:1101-8.
24. Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL. Na update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Ver Anti Infect Ther*. 2007; 5(4):727-43.

25. Adad SJ, Cancado CG, Etchebehere RM, Teixeira VP, Gomes UA, Chapadeiro E, et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch.* 2001; 438:254-8.
26. Silveira AB, D'Avila Reis D, Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Poole D et al. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. *Dig Dis Sci.* 2007; 52:2877-83.
27. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 2010; 115(1-2):5-13.
28. Basso B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J Exp Med* 2013; 3(1):-10.
29. Rottenberg M, Cardoni RL, Andersson R, Segura EL, Orn A. Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol.* 1988; 28(5):573-82.
30. Tarleton RL. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol Today.* 1995; 11(1):7-9.
31. Nickell SP, Gebremichael A, Hoff R, Boyer MH. Isolation and functional characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 1987; 138(3):914-21.
32. Krettli AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* 1976; 116(3):755-60.
33. Vaena de Avalos S, Blader IJ, Fisher M, Boothryd JC, Burleigh BA. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. *J Biol Chem.* 2002; 277(1):639-44.
34. Fichera LE, Albareda MC, Laucella AS, Postan M. Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. *Infect Immun.* 2004; 72(1):359-63.
35. Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation.* 2000; 102(24):3003-8.
36. 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(4):1433-40.

37. Vespa GN, 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.
38. Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun*. 1996; 64(6):1961-7.
39. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25<sup>high</sup> T cells balancing activated CD8<sup>+</sup> T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol*. 2006; 145(1):81-92.
40. Lieke T, Graefe SE, Klauenberg U, Fleischer B, Jacobs T. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun*. 2004; 72(12):6817-25.
41. Brunda MJ. Interleukin-12. *J Leukoc Biol*. 1994; 55(2):280-8.
42. Gately MK, Warriar RR, Honasoge S, Carvajal DM, Faherty DA, Connaughton SE, et al. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma in vivo. *Int Immunol*. 1994; 6(1):157-67.
43. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995; 13:251-76.
45. Golgher D, Gazzinelli RT. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*. 2004 Aug;37(5):399-409.únior GL, et al. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas disease. *Int Immunol*. 1994; 6:499-506.
46. 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.
47. 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*. 2010; 185(2):1150-7.
48. Dutra W O, Menezes C A S, Magalhães L M D, Gollob K J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol*. 2014; 36 (8) 377-387.

49. Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med.* 1991; 174(3):539-45.
50. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med.* 1992; 175(1):169-74.
51. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature.* 1988; 334(6179):260-2.
52. Reis DD, Jones EM, Tostes S, Jr., Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 48(5):637-44.
53. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(7):943-50.
54. Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun.* 2004; 72(9):5283-91.
55. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 2003; 71(3):1185-93.
56. Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 83: 165-172.
57. Ward LS, Guariento ME, Fernandes GA, Maciel RM. Serum cytokines in chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999; 32(3):285-9.
58. Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor cells and dominance of granzyme A CD8 lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48:637- 44.
59. Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98(3):299-304.

60. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun*. 2005; 73(12):7960-6.
61. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*. 2002; 18(6):262-5.
62. Machado FS, Koyama NS, Carregaro V, Ferreira BR, Milanezi CM, Teixeira MM, et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis*. 2005; 191(4):627-36.
63. Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 2000 ; 102(24):3003-8.
64. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, et al. Chronic Chagas disease cardiomyopathy patients display an increase in IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun* 2001;17:99-107.
65. Dutra WO, Martins-Filho OA, Cancado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Gazzinelli G, et al. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand J Immunol*. 1996; 43(1):88-93.
66. Menezes CA, Rocha MO, Souza PE, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol*. 2004; 137(1):129-38.
67. Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, Coelho JS, Chaves AC, Gollob KJ, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun*. 2007; 75(4):1886-94.
68. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(11):875-88.
69. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol*. 2012;3:51.
70. Mariano FS, Gutierrez FR, Pavanelli WR, Milanezi CM, Cavassani KA, Moreira AP, et al. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect*. 2008; 10(7):825-33.

71. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho O-A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.* 2009; 104(Suppl. I): 246-251.
72. de Araújo, F.F., Vitelli-Avelar, D.M., Teixeira-Carvalho, A., Antas, P.R.Z., Gomes, J.A.S, et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas disease. *PLoS Negl.Trop. Dis.* 2011 5(5): 992–999.
73. de Araújo, FF, da Silveira AB, Correa-Oliveira R, Chaves AT, Adad SJ, Fiuza, JA, et al . Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Hum. Pathol.*2011; 42(2): 299–301.
74. Sales Jr, PA, Golgher D., Oliveira RV, Vieira V., Arantes, RM., Lannes-Vieira, J, et al 2008. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosomacruzi*. *Microbes Infect.* 10, 680–688.
75. Kotner J, Tarleton R. Endogenous CD4(+) CD25(+) regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* 2007; 75(2):861-9.
76. de Moura Braz SC, de Melo AS, da Glória Aureliano de Melo Cavalcanti M, Martins SM, de Oliveira W Jr, da Silva ED, et al. Increase in the expression of CD4+CD25+ lymphocytic T cells in the indeterminate clinical form of human Chagas disease after stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Immunol.*2014; 34(8):991-8.
77. da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, Silva JS. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PloS Negl Trop Dis.* 2010; 4(2):e604.
78. Tosello Boari J, Amescua Vesely MC, Bermejo DA, Ramello MC, Montes CL, Cejas H, et al. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PloS Pathog* 2012;8(4)e 1002658.
79. Magalhaes LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO ,Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis* 2013; 207(4): 661–665.
80. Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2009; 199: 451–454.
81. Villani FN, Rocha MO, Nunes Mdo C, et al. *Trypanosoma cruzi*-induced activation of functionally distinct alphabeta and gammadelta CD4- CD8- T cells in individuals with polar forms of Chagas disease. *Infect Immun* 2010; 78: 4421–4430.

82. Adad SJ, Cancado CG, Etchebehere RM, Teixeira VP, Gomes UA, Chapadeiro E, et al. Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch.* 2001; 438(3):254-8.
83. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, et al. 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(5):1805-9.
84. 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(7):993-8.
85. da Silveira AB, D'Avila Reis D, de Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Poole D, et al. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. *Dig Dis Sci.* 2007; 52(10):2877-83.
86. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001; 2(8):675-80.
87. Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J Parasitol Res.* 2012;2012:507874.
88. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999; 284(5418):1313-8.
89. Kawai T, Shizuo Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors *Nature Immunology.* 2010; 11(5):373-384.
90. Akashi-Takamura S, Miyake K. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *J Infect Chemother.* 2006; 12(5):233-40.
91. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010; 140(6):805-20.
92. Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11(1):13-8.
93. O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol.* 2003; 24(6):286-90.
94. Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature.* 1991 ;351(6325):355-6.

95. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(2):588-93.
96. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11(5):373-84.
97. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*. 2001; 167(1):416-23.
98. Almeida IC, Gazzinelli RT. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol*. 2001; 70(4):467-77.
99. Ropert C, Gazzinelli RT. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol*. 2000; 3(4):395-403.
100. Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol*. 2004; 173(9):5688-96.
101. Pellegrini A, Guinazu N, Giordanengo L, Cano RC, Gea S. The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. *Future Microbiol*. 2011; 6(12):1521-33.
102. Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(12):895-906.
103. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2006; 177(6):3515-9.
- .
104. Oliveira AC, de Alencar BC, Tzelepis F, Klezewsky W, da Silva RN, Neves FS, et al. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. *PLoS Pathog*. 2010; 6(4):e1000870.
105. Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol*. 2004; 173(9):5688-96.

106. Sousa GR, Gomes JA, Fares RC, Damásio MP, Chaves AT, Ferreira KS, et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PloS One*.2014; 9(3):e87082.
107. Ferreira LR, Frade AF, Baron MA, Navarro IC, Kalil J, Chevillard C, Cunha-Neto E. Interferon- $\gamma$  and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. *World J Cardiol*. 2014; 6(8):782-90.
108. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun*. 2005; 73 (12):7960-7966.
109. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun*. 2001; 17 (1):99-107.
110. Sanoja C, Carbajosa S, Fresno M, Girones N. Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *PloS One*.2013; 8(6):e65820.
111. Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity, *Infect Immun* 2004; 74(9): 5283-5291.
112. Guedes PM, Gutierrez FR, Silva GK, Dellalibera-Joviliano R, Rodrigues GJ, Bendhack LM, et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. *PloS Negl Trop Dis*. 2012; 6(4):e1630.
113. Petersen CA, Krumholz KA, Burleigh BA. Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1-beta dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2005; 73(10):6974-80.
114. Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae Kc et al. Heterozygosity for the S180L variant of MAL/TIRAP, a gene expressing an adaptor protein in the Toll-like receptor pathway, is associated with lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis*. 2009; 199(12):1838-45.



**ANEXO 1***Artigo Científico***Participation of TLR2 and TLR4 in Cytokines Production by Patients with Symptomatic and Asymptomatic Chronic Chagas Disease**

Laura Denise Mendes da Silva<sup>1</sup>, Mariana Gatto<sup>1</sup>, Mariana Miziara de Abreu<sup>1</sup>,  
Marjorie de Assis Golim<sup>2</sup>, Érika Pelisson Nunes da Costa<sup>1</sup>, Francilene Capel  
Tavares<sup>1</sup>, Daniela Ramos Rodrigues<sup>3</sup>, Paulo Câmara Marques Pereira<sup>1</sup>, Ângela  
Maria Victoriano de Campos Soares<sup>3</sup>, Sueli Aparecida Calvi<sup>1</sup>

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, Bioscience Institute-UNESP-Botucatu, São Paulo, Brazil

## ABSTRACT

Chagas disease (CD), caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi), is a neglected disease and considered a serious problem of public health. Its evolution in an infected host occurs in two distinct stages: the acute stage which lasts 2 to 4 months and is characterized by high parasitemia, but no detection of specific signs and symptoms, which difficult its detection, and the chronic stage in which most individuals are diagnosed. At this second stage, most individuals present the indeterminate or asymptomatic chronic disease. However, about 30 to 40% of infected individuals become symptomatic and present the cardiac or digestive disease. One of the most important challenges in the DC study is to determine the mechanisms related to the host immune response that lead to these different clinical manifestations. The cellular immune response characterized by the release of pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 is considered crucial in host resistance. However, it is suggested that a fine control of this response must occur in order to avoid a perpetuated inflammatory process which results in tissue injury. This control was found to be responsible by the absence of clinical symptoms in individuals with the indeterminate chronic form and depends on activation of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$ . The pattern recognition receptors (PRRs), particularly the *Toll-Like Receptors* (TLRs) are extremely important in defining the cytokine profile that will be released in response to a microorganism. Therefore, our hypothesis was that patients with symptomatic and asymptomatic disease release different profile of cytokines, i.e pro-inflammatory and anti-inflammatory respectively, because TLRs involved in the production of each profile of cytokines, would be differently expressed or activated in these two groups. As expected, we found that mononuclear cells of patients with the cardiac form predominantly release IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 when compared with other groups. In contrast, patients with asymptomatic disease release predominantly IL-10 and TGF- $\beta$ . Of

note, TLR2 and TLR4 were involved in the production of both, pró-inflammatory and anti-inflammatory cytokines detected in symptomatic and asymptomatic patients, respectively. This finding did not allow us to stablish an association between the expression of these receptors and a determinate profile of cytokines, since stimulation of these receptors may lead to release of different profiles of cytokines in a dependency of the patients group that is being evaluated. Probable mechanisms involved in such differences are discussed.

## INTRODUCTION

Chagas disease (CD) whose etiological agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is neglected despite be a serious problem of public health , even in non-endemic countries [1-3]. According to the Pan American Health Organization, about 6 to 8 million of people are infected in the Americas, and 12,000 die each year [4]. In addition, in the last years, the number of reported cases has increased, especially in European countries like Spain, Italy and Switzerland, where most of the Latin immigrants are living [5-7]. The CDC (Centers for Disease Control and Prevention) estimates that in the USA more than 300,000 people are infected with *T. cruzi*. Most of these individuals acquired the infection in endemic countries, since despite the presence of the vector in USA, rare cases of disease acquired by this way have been documented [8].

The evolution of the disease involves two phases with distinct clinical manifestations. The acute phase lasts 2-4 months and is usually characterized by nonspecific symptoms, despite the presence of intense parasitaemia. Lack of treatment and the inefficiency of the immune system to completely eliminate the parasite ensure its persistence and the infected individual progresses to the chronic phase of the disease [9].

The clinical course of chronic disease is variable and ranges from no symptoms to severe disease with cardiovascular and /or gastrointestinal involvements. Most infected individuals present the indeterminate or asymptomatic chronic disease characterized by positive serology and no clinical manifestations [10].

However, about 30 to 40% of them develop symptomatic CD [11-13]. Cardiac disease is the most important clinical manifestation of chronic symptomatic CD due to its frequency and severity [14,15]. However, the digestive form mainly characterized by the development of megacolon and megaesophagus resulting from enteric neuronal damage by the parasite, has also an important degree of severity [16-18].

The immune response against *T. cruzi* is complex and involves many effectors and regulators components [19-21]. Cytokines such as IFN- $\gamma$ , produced during innate and specific immune response, are considered essential for the control of the intracellular replication of *T. cruzi*. Macrophages activated with this cytokine release TNF- $\alpha$  that induces a second activation signal in these cells, which greatly increase their production of trypanosomicide molecules such as NO [22-25]. During innate immune response the predominant source of IFN- $\gamma$  is NK cells stimulated by IL-12 produced by infected macrophages and or dendritic cells [9,26,27].

During the specific immune response, these cells instruct the CD4 response to a Th1 polarization [28]. This profile of CD4 response besides leads to the release of IFN- $\gamma$ , induces plasma cells to produce opsonizing antibodies at the same time that activates CD8 cells to destroy infected cells containing amastigotes of *T. cruzi*. These cells once activated are also important alternative source of IFN- $\gamma$  [19,29].

Also referring to specific immune response, other studies have shown a significant involvement of Th17 cells in resistance to infection with *T.cruzi*, since IL-17A, the main

cytokine produced by this subpopulation is extremely important for stimulation of pro-inflammatory cytokines release and neutrophils activation [30,31].

However, the cited mechanisms, although considered crucial for host resistance, at the same time, can be closely related to pathogenesis of disease. So, it is suggested that a fine control of them must occur for avoiding exacerbated responses that result in tissue damage. Fail in this control is associated with symptomatic forms of the disease, since in these patients a predominant inflammatory profile of response is found, versus an anti-inflammatory one in individuals with the indeterminate form [9].

The predominance of an anti-inflammatory profile in asymptomatic patients may be associated, among other factors, to their greater ability to producing suppressive cytokines such as IL-10. This cytokine can be produced by several cell types including monocytes/macrophages, Th2 and Treg. Its role must be balanced, in order to does not cause an overall suppression of effectors responses, that eliminate the parasite, but, at the same time, control these responses avoiding tissue damage [27,32-35].

Among the main factors that determine the profile of cytokines that is predominately released in response to a microorganism are the Toll like receptors (TLRs) [36-39]. Several molecules of *T. cruzi* have been identified as PAMPs to TLRs. The main ones are the glycoinositolfosfolípides (GIPLs) found in large amounts on the surface of trypanosomatids, including *T. cruzi*, which serve to anchor glycoproteins and lipopolysaccharides. Some studies have shown that GPIs derived from trypomastigotes (tGPIs) are recognized by TLR2 [40-42]. Another member of the GPI family, purified from epimastigotes (eGPIs) induces activation of the NF- $\kappa$ B by binding to TLR4 [43].

Several studies have evaluated the importance of signals by TLRs on the induction of susceptibility or resistance to infection with *T. cruzi* [37,38]. Most studies used knockout mice

to one or more of these receptors, and overall, the results showed that TLR2, TLR4, TLR7 and TLR9 are involved in mechanisms of resistance to infection with *T. cruzi*. Additionally, studies have shown the importance of these receptors in modulating both, the innate and adaptive immune response. They also shown that there is a degree of redundancy in the actions of various TLRs, which means that while each of the receptors has its individual involvement, the concomitant absence of various TLRs is that will actually determine susceptibility to infection, since *T. cruzi* has several ligands for different TLRs [37]. However, studies assessing the role of TLRs, in determining the different clinical manifestations of patients are scarce. Differences in the expression or activation of these receptors, specially TLR2 and TLR4, could be responsible for the predominant pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokine profile presented by patients with symptomatic or indeterminate form, respectively. Therefore, the current study evaluated the surface expression of TLR2 and TLR4 in monocytes and lymphocytes as well as the involvement of these receptors in the production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 e TGF- $\beta$  by patients with the cardiac, digestive and indeterminate form of Chagas disease.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Patients*

A number of 16, 13 and 15 patients, with digestive, cardiac and indeterminate form of Chagas disease, respectively, were evaluated. Overall, the group of patients consisted of 23 males and 21 females and were recruited from the General Service of Infectious diseases of the Clinical hospital - Botucatu Medical School . They were conducted to this service by the hemocenter from the same hospital when, at the time of blood donation, they had presented at least one positive serological test (ELISA, IFA, IHA) for Chagas disease. When they began to be monitored, they underwent more 3 serological tests of different principles

(ELISA/Chemiluminescence, IHA and IFA), and those who were positive for at least two of these tests were considered as chronic patients. Patients diagnosed with other concomitant infectious diseases presenting immunosuppression and pregnant women were excluded. Besides, 16 individuals who at the time of blood donation were considered negative for screening tests were evaluated as controls. This study was approved by the Research Ethics of the Botucatu Medical School and all patients and controls signed a free and informed consent form.

#### *Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation*

Mononuclear cells were obtained from peripheral blood by separation on Ficoll-Histopaque gradient (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, St. Louis, MO, USA) at 400g for 15 minutes. After, the cells were resuspended in complete medium consisted of RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, 40 ug / ml gentamycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 10% fetal bovine serum (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brazil). Cells identification, counting and viability were assessed by using Trypan Blue staining and concentration was adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/ml.

#### *Cell surface expression of TLR2 and or TLR4*

PBMCs suspensions ( $1 \times 10^6$ /ml) from patients and controls were distributed in tubes for cytometry analysis (Becton and Dickinson Company) and centrifuged for 5 minutes at 450g. After, cells were incubated with anti-human CD3 monoclonal antibody conjugated with PE-DY647 (EXBIO, Vestec, Czech Republic), anti-human CD14 monoclonal antibody conjugated with PE-DY647 (EXBIO, Vestec, Czech Republic) anti-human TLR4 conjugated

with FITC (Biolegend, San Diego, CA, EUA) and anti-human TLR2 conjugated with PE (Biolegend, San Diego, CA, EUA) for 15 minutes in the dark. After samples were centrifuged (450g, 10 minutes), supernatants were discarded and cells were suspended in 300 ul of ISOTON II electrolyte solution (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA.) For each test, there was a control tube in which cells were incubated with isotype control antibodies conjugated with the same fluorochromes used in the test. Analysis and cell acquisition were performed by flow cytometry (FACSCalibur™, Becton, Dickinson and Company) using the Cell Quest software (Becton, Dickinson and Company). Concerning the gating strategies applied to distinguish between cells populations analyzed via flow cytometry, FSC-SSC profile was used to distinguish total lymphocytes and monocytes and this subtype of cells were gated according to light scatter profile and the expression of CD3 and CD14. Acquisition was standardized to 10.000 events per sample.

#### *Stimulation of PBMCs*

PBMCs ( $1 \times 10^6$  cells/ml) in complete medium were plated in 24-well culture plates in the absence or presence of TLR agonists, according to the manufacturers' recommendations (Invivogen, San Diego, CA, USA). The following concentrations of agonists were used: 5 µg/ml peptidoglycan (PGN) from *Staphylococcus aureus* (TLR2 agonist) and 1 µg/ml ultra-pure lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* K12 (TLR4 agonist). PBMCs were incubated with the agonists at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. After incubation, the supernatants were aspirated, aliquoted and stored at -80°C prior to analysis.

#### *.Cytokine production*

The cytokines TNF-α, IFN-γ, IL-17, IL-10 and TGF-β were measured in culture supernatants using the CBA (Cytometric Beads Array) technique and analyzed by flow

cytometry using a FACSCalibur™ (Becton, Dickinson and Company), Cell Quest Software and FCAP Array Software (Becton, Dickinson and Company) according to the manufacturer's instructions. The limit of detection for TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 and TGF- $\beta$  were 0,7 pg/ml, 1,8 pg/ml, 0,3 pg/ml, 0,13 pg/ml and 14,9 pg/ml respectively.

### *Statistical Analysis*

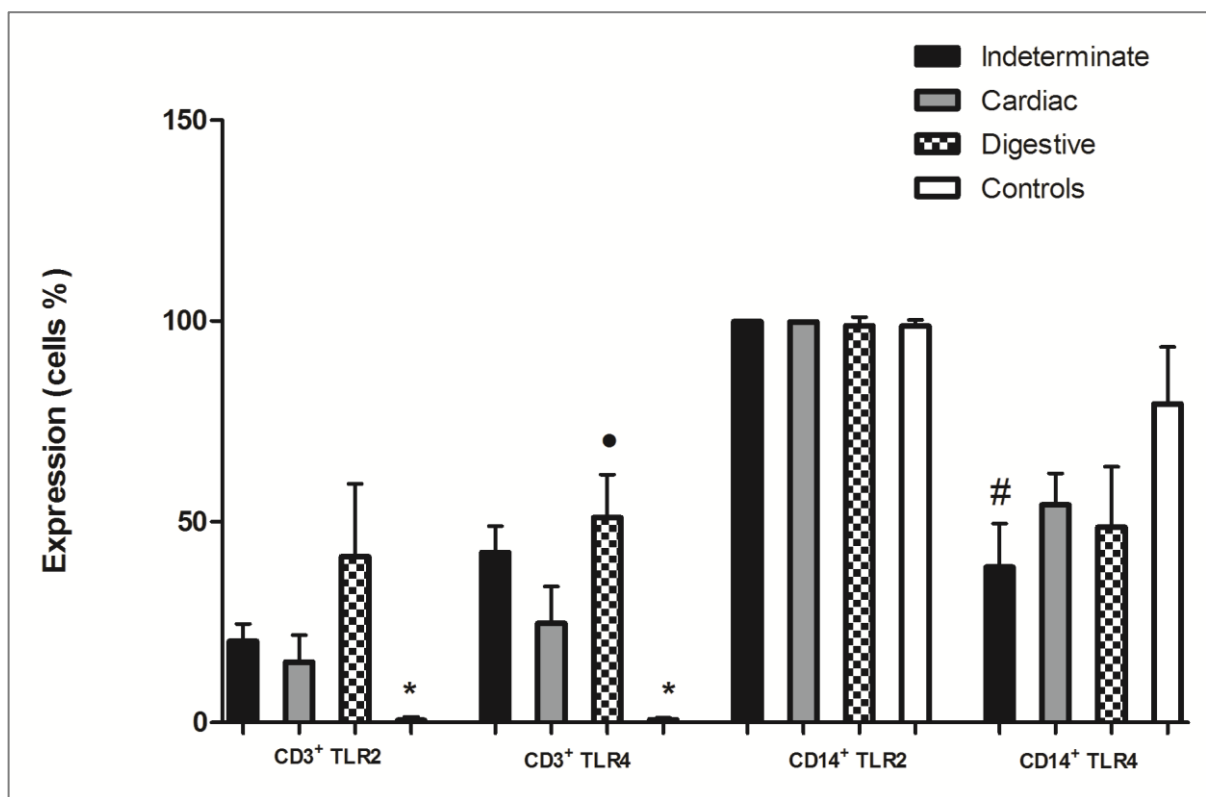
Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism Version 5.01 for Windows, GraphPad Software, Inc., (San Diego, California - USA). For analysis of results referring TLRs expression on CD3<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> cells (mean of fluorescence intensity and cells percentage), ANOVA test for independent samples followed by means comparison by Multiple Tukey-Kramer test were used. For cytokines production analysis, nonparametric t-test followed by medians comparison by Kruskal-Wallis test were performed. The significance level for all analyses was set at 5%.

## **RESULTS**

### *Expression of TLR2 and TLR4 on monocytes and lymphocytes*

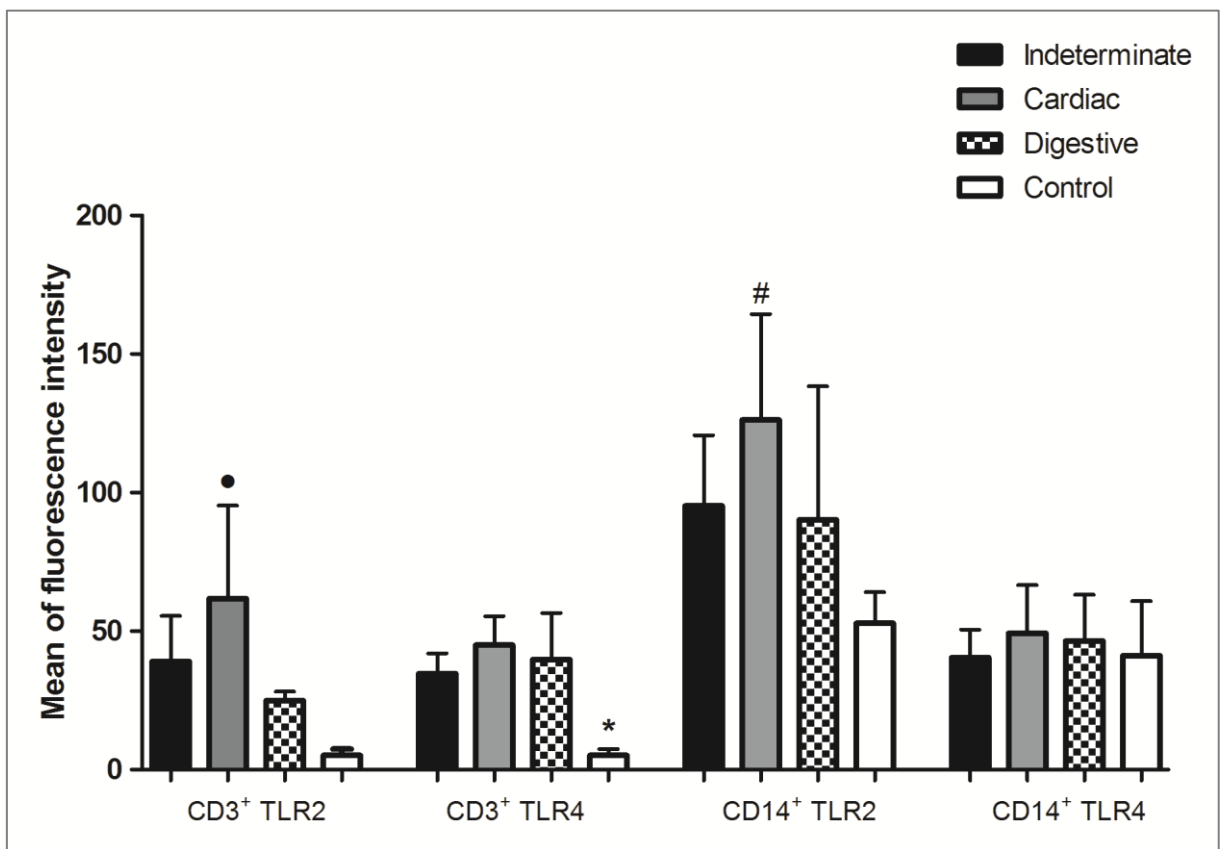
The expression of TLR2 and TLR4 on the surface of lymphocytes and monocytes of control subjects and patients with indeterminate, cardiac and digestive forms was assessed by measuring the percentage of CD3<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> cells positive for these receptors as well as by the mean of intensity of fluorescence (MIF). We found that the 3 groups of patients presented higher percentages of CD3 cells expressing TLR2 in relation to control individuals. Among the 3 groups of patients, those with the digestive form trended to present higher percentages. No differences among the 4 groups were detected in relation to the percentage of CD14 cells that express this receptor (Figure 1). Still, in relation to TLR2 expression, CD3 cells from the 3 groups of patients presented higher means of fluorescence intensity in relation to control

groups, with those with cardiac form presenting higher values in comparison to other two groups. The same profile of response was obtained when MIF referring TLR2 expression was analyzed in CD14 cells (Figures 2 and 3). Concerning TLR4, patients of the 3 groups presented higher percentages of CD3 cells expressing this receptor when compared to controls, without however no differences among them. Contrary results were detected in relation to CD14 cells percentage, as lower values were found in patients groups and mainly in those with the indeterminate form (Figure 1).

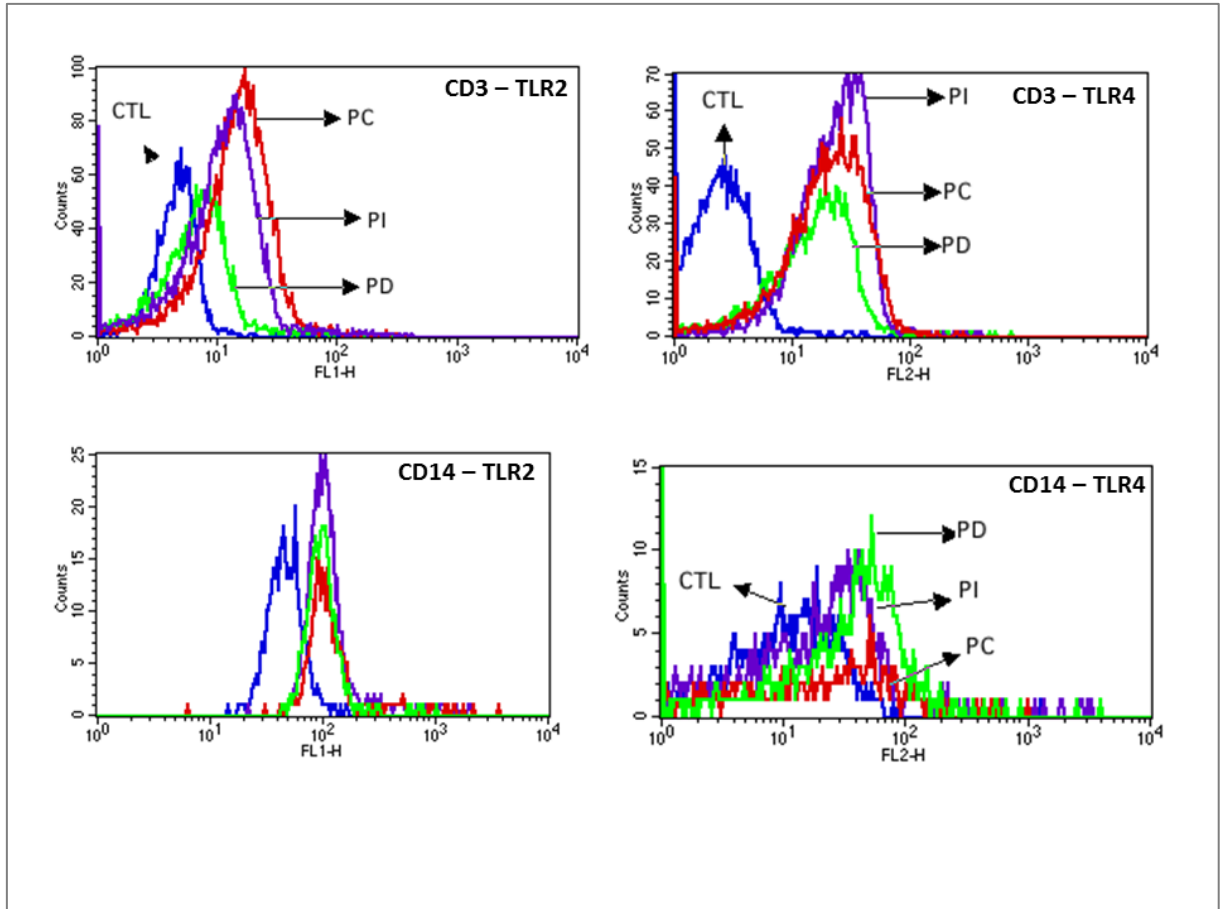


**Figure 1. Expression of TLR2 and TLR4 in CD3<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> cells.** Percentages of CD3<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> cells expressing TLR2 and TLR4 in patients with indeterminate, cardiac and digestive forms of Chagas disease and control subjects. Gating strategy was used to distinguish between cell populations analyzed by flow cytometry. FSC-SSC profiles were used to distinguish monocytes and total lymphocytes. The results are represented as mean  $\pm$  standard deviation. \*p < 0.05 control subjects x indeterminate, cardiac and digestive patients. • p < 0.05 digestive patients x cardiac patients. # p < 0.05 indeterminate patients x control subjects.

Analysis of MIF referring to TLR4 expression by CD3 and CD14 cells did not show significant differences among the groups (Figures 2 and 3). Overall, considering the two evaluations (percentages of cells and MIF) we can consider that patients with the cardiac and digestive form trend to express higher levels of TLR2 in relation to those with the indeterminate form. Patients with the digestive form trend to express higher levels of TLR4 in relation to other patients.



**Figure 2. Mean of fluorescence intensity of TLR2 and TLR4.** TLR2 and TLR4 expression evaluated by mean of fluorescence intensity (MIF) in CD3<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> cells from patients with indeterminate, cardiac and digestive forms of Chagas disease and control subjects. The results are represented as mean  $\pm$  standard deviation. \*  $p < 0.05$  controls subjects x indeterminate, cardiac and digestive patients. •  $p < 0.05$  cardiac x digestive patients. #  $p < 0,05$  cardiac x indeterminate, digestive and control subjects.



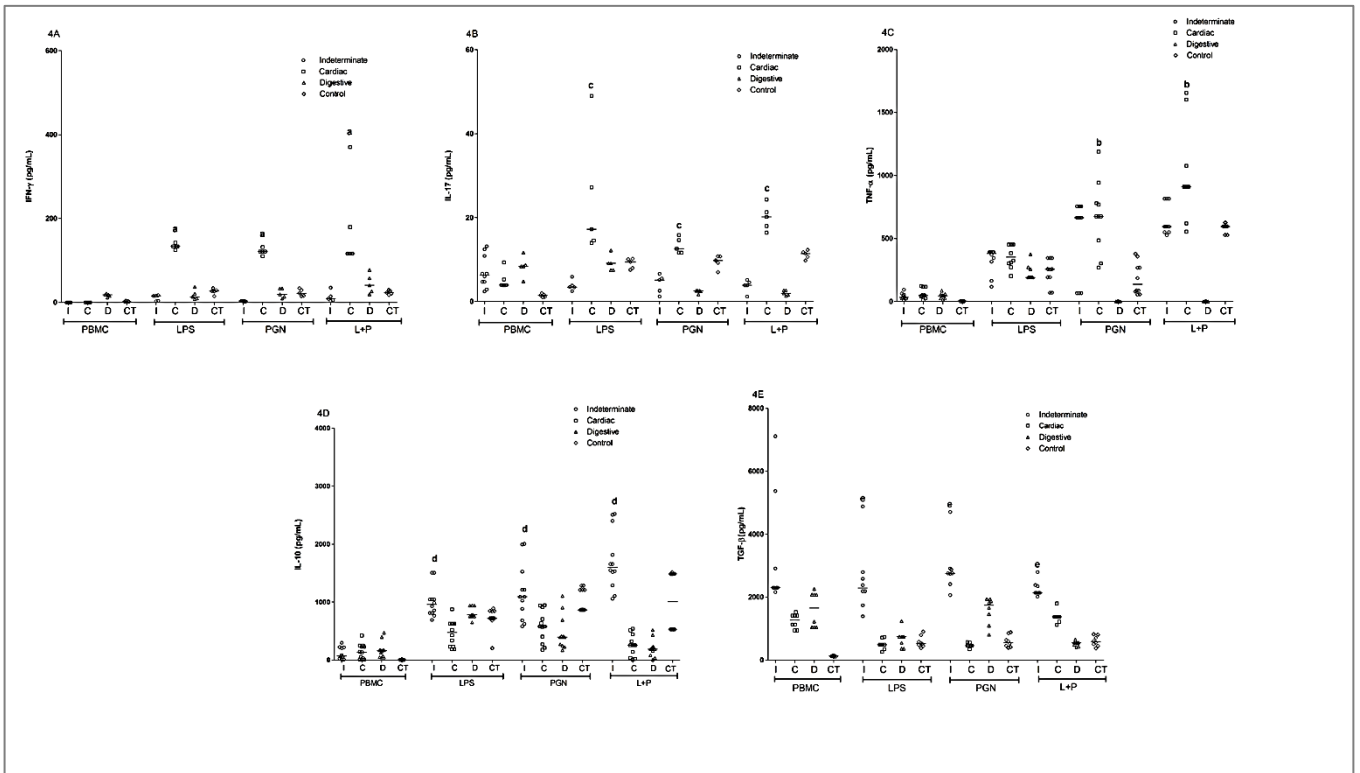
**Figure 3. Histograms representatives of the expression of TLR2 and TLR4.** Histograms representatives of the results relative to the expression of TLR2 and TLR4 by CD3<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> cells from control subjects (CTL), patients with digestive (PD), cardiac (PC) and indeterminate (PI) forms of Chagas disease, evaluated by mean of fluorescence intensity (MIF).

#### *Participation of TLR2 and TLR4 in cytokine production*

After analyzing TLR2 and TLR4 expression in the 3 groups of patients and control subjects, we assessed their participation in cytokines production. For this, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-10 and TGF- $\beta$  production was evaluated after PBMCs stimulation with PGN and/or LPS, agonists of TLR2 and TLR4, respectively (Figure 4). PBMCs from patients with the cardiac form produced significantly higher levels of IFN- $\gamma$  when compared to other groups (Figure 4A). Of note, this higher production occurs after cells stimulation with PGN and/or

LPS which means that both TLR2 and TLR4 are involved in this cytokine production . Similar results were obtained in relation to IL-17 production. (Figure 4B) Patients with the cardiac form also produce higher levels of TNF- $\alpha$  when compared to other groups. However, this result was obtained only after stimulation with LPS (Figure 4C).

Different results, however, were found regarding IL-10 (Figure 4D) and TGF- $\beta$  (Figure 4E) production, since higher production of these cytokines was detected in patients with the indeterminate form, after cells stimulation with both agonists. Overall, we detected that, exception for TNF- $\alpha$ , both TLR2 and TLR4 are involved in the production of all the cytokines evaluated. However, stimulation of these receptors in patients with the cardiac form leads to higher production of pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , IL-17 and TNF- $\alpha$ , while the stimulation of the same receptors in patients with the indeterminate form results in higher production of anti- inflammatory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$ . No important differences were detected in the results presented by patients with the digestive form compared to the other groups.



**Figure 4. Cytokine production after stimulation with LPs and PGN agonists.** IFN- $\gamma$  (A) IL-17 (B), TNF- $\alpha$  (C), IL-10 (D) TGF- $\beta$  (E) production by PBMCs from patients with indeterminate, cardiac and digestive forms of Chagas disease and controls subjects after stimulation with PGN (TLR2 agonist), LPS (TLR4 agonist) and LPS + PGN. Results are expressed as medians. Letters represent significant differences between the four groups for each stimulus.

## DISCUSSION

In this study, we hypothesized that differences in cytokines profile presented by cells of symptomatic and asymptomatic chagasic patients could be associated to differences on expression and/or in signals provided by TLR2 and/or TLR4 that are the main TLRs involved in the recognition of *T. cruzi* PAMPs. The experimental approach was to assess in each group, whether there is a differential expression of these receptors as well as to analyze the profile of cytokines produced by mononuclear cells stimulated with agonists of these receptors.

We found that patients with cardiac form predominantly release, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 in contrast with those with indeterminate form that produce IL-10 and TGF- $\beta$ . These

findings corroborate recent studies showing that cardiac Chagas patients exhibit a strong inflammatory response expressed by higher levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6 compared to those with indeterminate form that released greater IL-10 levels [44]. Accordingly, other studies have shown, a predominance of Th1-type T cells in myocardium in infiltrate and in peripheral blood cells of patients with cardiac form [45,46] as a consequence of the chemokines profile released at infected site [47-49]. The inflammatory infiltrate composed by these cells in myocardium is responsible for high IFN- $\gamma$  production of detected on the periphery [50,51].

In addition to Th1 cells, a high number of CD8 cells producing TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  [52,53] but a reduced number of Tregs cells secreting IL-10 was found. In contrast, in patients with indeterminate form high IL-10 levels associate to greater percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells was detected [54]. Besides Tregs, monocytes of indeterminate patients produce higher levels of IL-10 than the cardiac patients [32].

Based on these results ,in the present study, although we have not identified the populations of mononuclear cells that release the cytokines tested in the supernatants, we can suggest that Th1 and CD8 cells are preferentially induced in cardiac patients , which consequent higher production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . On the contrary, in indeterminate patients, monocytes and Tregs are induced to release higher IL-10 and TGF- $\beta$  levels.

Regarding specifically to IL-17, our results suggest its participation on the mechanisms inducing myocarditis, since high levels were detected in patients with cardiac disease. At first, this interpretation is quite consistent, since IL-17 is traditionally regarded as potent pro-inflammatory cytokine. However, it is not in agreement with more recent studies showing that this cytokine has a pivotal role in controlling inflammatory response in myocardium. Mice infected with *T. cruzi* and treated with anti-IL17A monoclonal antibody,

presented an increase in myocarditis and mortality [55]. Other studies have shown that high IL-17 production is associated with better cardiac function [31,56]. Regulation of the inflammatory infiltrate by IL-17 involves the inhibition of Th1 cells differentiation, production of cytokines and chemokines and the influx of inflammatory cells into the cardiac tissue. Additionally, regulation by IL-17 has been associated to activation of neutrophils producing IL-10 [57]. Despite these studies, we can consider that in cardiac patients analyzed in this study, the preponderant role of IL-17 was pro-inflammatory.

In this study, the analysis of the involvement of TLR2 and TLR4 in the differences in cytokines profiles presented by symptomatic and asymptomatic patients showed that both receptors are involved in the production of all the cytokines analyzed. However, stimulation of these two receptors in symptomatic patients, particularly those with the cardiac form, leads to preferential production of pro-inflammatory cytokines in contrast with anti-inflammatory ones in indeterminate patients. Thus, stimulation of the same receptor in different individuals may lead to production of pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines.

The involvement of these receptors in the production of pro- and anti-inflammatory cytokines is supported by previous studies showing that different GPIs derived from the *T. cruzi* are recognized by TLR2 or TLR4 and that the signals provided by both have an important role in either susceptibility or resistance of the host to infection [58-63]. Thus, the stimulation of the same receptor may lead to either production of pro or anti-inflammatory cytokines, depending on the individual.

In an attempt to establish an association between cytokine production and TLR2 and TLR4 expression by patients cells, we can suggest that one of the explanations for the predominant inflammatory response profile in patients with cardiac disease in relation to the digestive, could be that the former tended to express a greater expression of TLR2 receptor

,in both CD3<sup>+</sup> cells and in CD14<sup>+</sup> cells, which did not occur with digestive patients, in which the highest levels were only detected in CD3<sup>+</sup> cells. The participation of TLR2 in the development of cardiac disease has been highlighted. Studies have shown the fundamental role of this receptor in signaling for the production of IL1- $\beta$  considered an important mediator of cardiomyocytes hypertrophy in mice infected with *T. cruzi* [64].

However, the above explanation is not consistent when we analyzed the production of IL-10 and TGF- $\beta$ . As the two receptors are also involved in the production of these cytokines, patients with the cardiac form should also produce high levels of them, which did not occur.

High polymorphism of TLRs and their adapter molecules are reported in the literature. This process may explain different responses among individuals after activation of the same receptor. This can be one possible explanation for our results. A study that evaluated 169 patients with chronic Chagas' disease and 76 asymptomatic individuals found that *T. cruzi*-infected individuals who are heterozygous for the MAL/TIRAP S180L variant, that leads to a decrease in signal transduction upon ligation of TLR2 or TLR4 to their respective ligands, may have a lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy [65].

Thus, studies aiming to analyzing this polymorphism in patients and its consequences for the development of the different manifestations of the disease should be encouraged. At first, we consider that in addition to patients with cardiac disease, those with digestive form, could also present important differences in relation to asymptomatic individuals. However, these differences were clear only in individuals with cardiac involvement. We believe that further analysis of the clinical conditions of each patient and his cytokines response are needed to confirm these results.

## CONCLUSIONS

Together, our results contribute to a better understanding of immune response mechanisms provided by the host infected with *T. cruzi*, focusing on those involved in the different clinical manifestations of the disease, which are a major challenge for researchers that target future interferences in these patients, aiming at the end, to prevent the development of symptomatic chronic Chagas disease.

## ACKNOWLEDGMENTS

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

## REFERENCES

- [1] Moncayo A, Ortiz Yanine MI (2006). An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 100(8): 663-77. PMID :17227647
- [2] Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol* 24(4): 655-681. PMID: 21976603
- [3] Garcia MN, Woc-Colburn L, Aguilar D, Hotez PJ, Murray KO. (2015) Historical Perspectives on the Epidemiology of Human Chagas Disease in Texas and Recommendations for Enhanced Understanding of Clinical Chagas Disease in the Southern United States. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(11):e0003981. doi: 10.1371/journal.pntd.0003981. eCollection 2015 Nov. Review.

- [4] Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde. Chagas disease [Internet]. Washington: PAHO; 2015 [acesso 30 Jul 2015]. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743/](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743/)
- [5] Muñoz J, Gómez I Prat J, Gállego M, Gimeno F, Treviño B, López-Chejade P, et al. (2009) Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting:immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain).Acta Trop111(1):51-55. PMID:19426663
- [6] Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, et al. (2010) Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva Switzerland. PloS Negl Trop Dis 4(2):e592.PMID: 20126397
- [7] Albajar-Vinas P, Jannin J. (2011) The hidden Chagas disease burden in Europe. Euro Surveill 16(38): pii: 19975.PMID: 21958529
- [8] Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. Parasites - American Tripanosomíasis (also known as Chagas Disease): Epidemiology & Risk Factors [Internet]. Atlanta: CDC; 2015 [acesso 20 Set 2015]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>
- [9] Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. (2014) Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease.PLoS Negl Trop Dis 8(7):e3010. doi: 10.1371/journal.pntd.0003010. eCollection 2014. Review. PMID: 25077613
- [10] Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis DD, et al. . (2009) Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz.;10 (4 Suppl 1): 208-218.

- [11] Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. (2012) Current Understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol.*34(6):753-770. PMID:23076807
- [12] Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. (2013) Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol.* 27;(62):767-776. PMID: 23770163
- [13] Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010 ;375(9723):1388-1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X. PMID:20399979
- [14] Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL. (2007) An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Opin Anti Infect Ther* 5(4):727-743. PMID:17678433
- [15] Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. (2015) The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. *Clin Cardiol* 38(9):565-9. doi: 10.1002/clc.22421. PMID:25993972
- [16] Adad SJ, Cançado CG, Etchebehere RM, Teixeira VP, Gomes UA, Chapadeiro E, et al. (2001) Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis. *Virchows Arch.*438:254-8. PMID:11315622
- [17] Silveira AB, D'Avila Reis D, Oliveira EC, Neto SG, Luquetti AO, Poole D, et al. . (2007) Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. *Dig Dis Sci* 52:2877-83. PMID:17385032
- [18] Coura JR, Borges-Pereira J. (2010) Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.*115(1-2):5-13. PMID:20382097

- [19] Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. (2010) The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*.12:e29. PMID:20840799
- [20] Dutra W O, Menezes C A S, Magalhães L M D, Gollob K J. (2014) Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol*. 36 (8) 377-387. PMID:24611805
- [21] Cardillo F, de Pinho RT, Antas PR, Mengel J. (2015) Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathog Dis*. Dec;73(9). pii: ftv082. doi: 10.1093/femspd/ftv082. PMID:26438729
- [22] Rodrigues AA, Saosa JS, da Silva GK, Martins FA, da Silva AA, Souza Neto CP, et al. (2012) IFN- $\gamma$  plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. *PLoS Negl Trop Dis* 6(4):e1598. doi: 10.1371/journal.pntd.0001598. PMID:22509418
- [23] Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, 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(12):4862-4867. PMID:7591147
- [24] Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. (2001) Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 158(4):1433-1440. PMID 11290561
- [25] Vespa GN, 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(11):5177-5182. PMID:7523307

- [26] Vaena de Avalos S, Blader IJ, Fisher M, Boothryd JC, Burleigh BA. (2002) Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. *J Biol Chem* 277(1):639-644.PMID: 11668183
- [27] Sathler-Avelar R, Lemos EM, Reis DD, Medrano-Mercado N, Araújo-Jorge TC, Antas PR, et al. (2003) Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*.*Scand J Immunol*, 58(6):655-663. PMID:14636422
- [28] Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. (1996) Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 64(6):1961-7.PMID:8675294
- [29] Chessler AD, Unnikrishnan M, Bei AK, Daily JP, Burleigh BA. (2009) *Trypanosoma cruzi* triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. *J Immunol* 182(4):2288-96. doi: 10.4049/jimmunol.0800621.PMID:19201883
- [30] Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H. (2010) IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 185(2):1150-1157. PMID:20562260
- [31] 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(4):661-665. doi: 10.1093/infdis/jis724. PMID:23204182
- [32] Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, et al. (2004) Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* 72(9):5283-5291.PMID: 15322024

- [33] Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, et al. (2008) Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol* 68(5):516-525. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02167.x.PMID:18803607
- [34] Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, et al. (2007) Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci* 12:2797-2806.PMID:17485260
- [35] de 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 effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology* 217(8):768-777. PMID:22672991
- [36] Kawai T, Akira S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5):373-384. PMID:20404851
- [37] Pellegrini A, Guinazu N, Giordanengo L, Cano RC, Gea S. (2011) The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. *Future Microbiol* 6(12):1521-1533.PMID:22122446
- [38] Gazzinelli RT, Denkers EY. (2006) Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 6(12):895-906.PMID:17110955
- [39] Ashour DS. (2015) Toll-like receptor signaling in parasitic infections. *Expert Rev Clin Immunol* 11(6):771-780. doi: 10.1586/1744666X.2015.1037286. PMID:25896399

- [40] Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, et al. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167(1):416-423. PMID:11418678
- [41] Almeida IC, Gazzinelli RT. (2001) Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol* 70(4):467-477. PMID:11590183
- [42] Ropert C, Gazzinelli RT. (2000) Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 3(4):395-403. PMID: 10972501
- [43] Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT, et al. (2004) Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T.cruzi. *J Immunol*. 173(9):5688-5696. PMID:15494520
- [44] Sousa GR, Gomes JA, Fares RC, Damásio MP, Chaves AT, Ferreira KS, Nunes MC et al. (2014) Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PloS One* 9(3):e87082. PMID:24603474
- [45] Cunha-Neto E, Kalil J. (2001) Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmunity* 34: 187–192. doi: 10.3109/08916930109007383. PMID:11908776
- [46] Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. (2003) Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas'

disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 71(3):1185-1193. PMID:12595431

[47] Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. (2002) Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* 18(6):262-5. PMID:12036740

[48] Marino AP, Silva AA, Santos PV, Pinto LM, Gazzinelli RT, et al. (2005) CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 Suppl 1: 93–96. doi: 10.1590/s0074-02762005000900015. PMID:15962104

[49] Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, et al. (2005) Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun* 73(12):7960-7966. PMID: 16299288

[50] Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, et al. (2001) Chronic Chagas disease cardiomyopathy patients display an increase in IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun* 17:99-107. PMID:11488642

[51] Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. (2003) Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 71(3):1185-1193. PMID: 12595431

[52] Lannes-Vieira J. (2003) *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(3):299-304. PMID:12886406

- [53] Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, et al. (1993) Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor cells and dominance of granzyme A CD8 lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 48:637–644. PMID:8517482
- [54] de Araújo, F.F., da Silveira, A.B., Correa-Oliveira, R., Chaves, A.T., Adad, S.J., Fiuza, J.A, et al. 2011. Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Hum. Pathol.* 42, 299–301. PMID:21238788
- [55] da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, Silva JS. (2010) IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PloS Negl Trop Dis* 4 (2):e604. PMID: 20169058
- [56] Guedes PM, Gutierrez FR, Silva GK, Dellalibera-Joviliano R, Rodrigues GJ, Bendhack LM ,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(4):e1630. PMID:22545173
- [57] Tosello Boari J, Amescua Vesely MC, Bermejo DA, Ramello MC, Montes CL, Cejas H, Gruppi A et al. (2012) IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PloS Pathog* 8(4)e 1002658. PMID:22577359
- [58] Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, et al. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167(1):416-423. PMID:11418678

- [59] Almeida IC, Gazzinelli RT. (2001) Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J Leukoc Biol* 70(4):467-477. PMID:11590183
- [60] Ropert C, Gazzinelli RT. (2000) Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 3(4):395-403. PMID:10972501
- [61] Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli RT, Golenbock DT et al. (2004) Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T.cruzi. *J Immunol* 173(9):5688-5696. PMID:15494520
- [62] Pellegrini A, Guinazu N, Giordanengo L, Cano RC, Gea S. (2011) The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. *Future Microbiol* 6(12):1521-1533. PMID:22122446
- [63] Gazzinelli RT, Denkers EY. (2006) Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 6(12):895-906. PMID:17110955
- [64] Petersen CA, Krumholz KA, Burleigh BA. (2005) Toll-like receptor 2 regulates interleukin-1-beta dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 73(10):6974-80. PMID:16177377
- [65] Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Fae KC, et al. (2009) Heterozygosity for the S180L variant of MAL/TIRAP, a gene expressing an adaptor protein in the Toll-like receptor

pathway, is associated with lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis* 199(12):1838-45. PMID:19456234

## ANEXO 2

FACULDADE DE MEDICINA DE  
BOTUCATU -UNESP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Papel dos TLR-2 e TLR-4 na produção de citocinas em pacientes chagásicos crônicos

**Pesquisador:** Laura Denise Mendes da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 13005913.8.0000.5411

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

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

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 233.454

**Data da Relatoria:** 01/04/2013

**Apresentação do Projeto:**

A doença de Chagas é causada pelo agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), o qual é transmitido pela picada de um inseto denominado barbeiro. Quando o sistema imune do paciente entra em contato com esse parasita, são ativados alguns receptores celulares, chamados Toll-like (TLRs), os quais são responsáveis por produzirem certas substâncias, chamadas citocinas. Essas citocinas estão ligadas à reação do sistema de defesa da pessoa sendo que podem contribuir para a morte do parasita ou para sua resistência.

É uma doença endêmica em 21 países das Américas com 8 milhões de pessoas infectadas e cerca de 100 milhões de pessoas vivendo em área de risco. Atualmente, no Brasil predominam os casos crônicos da doença com aproximadamente 3 milhões de indivíduos infectados.

Os autores afirmam que na doença de Chagas apesar do conhecimento por meio de estudos experimentais, do envolvimento de mediadores pró e anti-inflamatórios na imunidade inata assim como dos TLRs, não se conhece ainda qual é a precisa ligação entre eles em pacientes. Além disso, não há estudos a respeito da participação dos TLR na produção de mediadores pró e anti-inflamatórios e seu envolvimento nas diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas crônica. Referem ainda que uma das principais questões ainda não esclarecida, e que pode estar relacionada ao desenvolvimento da resposta imune, devido a interação parasita/hospedeiro, é que alguns pacientes permanecem por muitos anos na fase indeterminada e outros evoluem para as

**Endereço:** Chácara Bulgnoli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**CEP:** 18.615-070

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**Telefone:** (14)3880-1808

**E-mail:** cep@fmb.unesp.br

## ANEXO 2

FACULDADE DE MEDICINA DE  
BOTUCATU -UNESP



formas cardíaca ou digestiva. Além disso, não existe até o momento, um marcador que determine se o indivíduo irá evoluir ou não para as formas clínicas da doença. Baseados na ausência destas informações e na hipótese de que receptores semelhantes à Toll (TLRs) exerçam papel diferente na produção de citocinas em pacientes com as formas cardíaca e digestiva quando comparados aos com a forma indeterminada, os autores acreditam que o estudo do envolvimento dos TLR na produção de citocinas de perfil Th1, Th2, Th17 e Treg em pacientes com as formas indeterminada, cardíaca e digestiva, permitirá a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese e evolução da doença.

Trata-se de um estudo que será realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB). Serão estudados 60 indivíduos chagásicos crônicos, sendo 20 para cada fase da doença: Indeterminada, cardíaca e digestiva. Esses pacientes chagásicos crônicos são atendidos no Ambulatório de Moléstias Infecciosas Geral do HCFMB. E como grupo controle, serão estudados 20 indivíduos normais doadores de sangue do Hemocentro do HCFMB.

Serão incluídos apenas os pacientes doentes e controles que concordarem em participar do estudo, após o devido esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Critérios de Inclusão:** Serão incluídos no Grupo 1 os indivíduos doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, com sorologia negativa para Doença de Chagas, de ambos os sexos, maiores de 18 anos e sem antecedentes epidemiológicos para a doença. Serão incluídos no Grupo 2 os pacientes que apresentarem pelo menos 2 testes sorológicos de diferentes princípios positivos para Doença de Chagas e não apresentarem alterações no eletrocardiograma, raió-x de tórax, esfago-estômago-duodeno e enema opaco. Serão incluídos no Grupo 3 os pacientes que apresentarem pelo menos 2 testes sorológicos de diferentes princípios positivos para Doença de Chagas e apresentarem alterações no eletrocardiograma e raió-x de tórax, mas não apresentarem alterações no esfago-estômago-duodeno e enema opaco. Serão incluídos no Grupo 4 os pacientes que apresentarem pelo menos 2 testes sorológicos de diferentes princípios positivos para Doença de Chagas e não apresentarem alterações no eletrocardiograma e raió-x de tórax, mas apresentarem alterações no esfago-estômago-duodeno e/ou enema opaco.

**Critério de Exclusão:** Gravidez, presença de outras moléstias infecciosas e doenças granulomatosas.

Os autores referem que haverá coleta de sangue dos pacientes para realização dos experimentos.

Nos experimentos, a expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 será avaliada em pacientes chagásicos nas fases indeterminada, cardíaca e digestiva por meio da técnica de citometria de fluxo. Também será avaliada a produção das citocinas TNF- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-17, IL-10 e

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-070

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1808

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

## ANEXO 2

FACULDADE DE MEDICINA DE  
BOTUCATU -UNESP



TGF- $\beta$ , utilizando kits de CBA, em sobrenadantes de cultura de PBMC de pacientes chagásicos nas fases Indeterminada, cardíaca e digestiva após estimulação específica com agonistas do TLR-2 e TLR-4.

Os autores referem que os experimentos serão realizados 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 Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avallar o papel dos TLR-2 e TLR-4 na produção de citocinas em pacientes com a forma cardíaca, digestiva e Indeterminada da doença de Chagas.

**Objetivo Secundário:**

Avallar a expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4 em pacientes chagásicos na fase Indeterminada, cardíaca e digestiva através da técnica de citometria de fluxo. Avallar a produção das citocinas TNF- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-17, IL-10 e TGF- $\beta$  utilizando kits de CBA, em sobrenadantes de cultura de PBMC de pacientes chagásicos na fase Indeterminada, cardíaca e digestiva após estimulação específica com agonistas do TLR-2 e TLR-4.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Conforme projeto apresentado pelos pesquisadores, a pesquisa:

-trará benefícios para os pacientes portadores de Doenças de Chagas, pois permitirá a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese e evolução da doença.

-oferecerá mínimos riscos aos pacientes, pois os pesquisadores Informam que além dos dados coletados de prontuário, haverá necessidade de doação de 20 ml de sangue venoso periférico para realização dos experimentos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa tem fundamentação científica. Metodologia adequada para a pesquisa proposta. Trata-se de um estudo que será realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB). Serão estudados 60 indivíduos chagásicos crônicos, sendo 20 para cada fase da doença: Indeterminada, cardíaca e digestiva. Esses pacientes chagásicos crônicos são atendidos no

Endereço: Chácara Butgnoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 13.615-070

UF: SP Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1808

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

## ANEXO 2

FACULDADE DE MEDICINA DE  
BOTUCATU -UNESP



Ambulatório de Moléstias Infeciosas Geral do HCFMB. E como grupo controle, serão estudados 20 indivíduos normais doadores de sangue do Hemocentro do HCFMB. Os autores referem que haverá coleta única de 20 ml de sangue venoso periférico dos pacientes pelo próprio pesquisador para realização dos experimentos. E para o grupo controle, a coleta acontecerá imediatamente após o procedimento de doação de sangue, utilizando a mesma punção venosa.

Serão incluídos apenas os pacientes doentes e controles que concordarem em participar do estudo, após o devido esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O TCLE encontra-se adequado de forma clara e objetiva.

O autor refere que haverá apoio financeiro do HCFMB, e o cálculo de custo foi realizado pelo próprio autor, sendo estimados em R\$25.000,00 para materiais envolvendo a parte experimental (Kits CBA para citocinas, Anticorpos para citometria e Reagentes em geral e material plástico) e R\$1.000,00 para insumos e mão de obra na coleta de sangue dentro do HCFMB.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O pesquisador apresenta o Termo de compromisso da Resolução CNS 196/96, Folha de rosto assinada, Termo de comprometimento de entrega do relatório final, Autorização do Diretor do Hemocentro do HCFMB, Autorização da chefe do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu, Autorização para uso de arquivos médicos e Autorizações da Superintendência do HCFMB e do responsável pelo Ambulatório envolvido do HCFMB. A pesquisadora apresenta o TCLE adequado à Resolução CNS 196/96.

**Recomendações:**

Nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A pesquisa é relevante e permitirá a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese e evolução da doença de Chagas. O projeto atende a Resolução MS/CNS 196/96, desta maneira, sugiro sua aprovação sem necessidade de envio à CONEP.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião do CEP de 01/04/2013, sem necessidade de envio à CONEP.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Telefone: (14)3880-1808

CEP: 18.618-970

Município: BOTUCATU

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

## ANEXO 3



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA

Departamento de Doenças Tropicais

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Portadores da doença de Chagas**

A doença de Chagas é causada por um protozoário o qual é transmitido pela picada de um inseto chamado barbeiro. Quando o sistema imune do paciente entra em contato com esse parasita, são ativados alguns receptores celulares, chamados Toll-like, os quais são responsáveis por produzirem certas substâncias, chamadas citocinas. Essas citocinas estão ligadas à reação do sistema de defesa da pessoa contribuindo para a morte do parasita ou para sua sobrevivência. No Hospital das Clínicas da UNESP, será realizada a pesquisa, denominada **“Papel dos receptores TLR-2 e TLR-4 na produção de citocinas em pacientes chagásicos crônicos”** na qual serão dosadas as citocinas e os receptores celulares (Toll-like). Essa pesquisa permitirá detectar possíveis diferenças na resposta imune desses pacientes. Por isso, estamos convidando você, sem nenhuma obrigação, a contribuir com nossa pesquisa e doar 20 ml de sangue, o qual será obtido por punção da veia do braço no dia da consulta no Ambulatório de Moléstias Infecciosas. A coleta será feita por profissional devidamente capacitado e com material estéril, podendo ocorrer um leve incômodo no braço, mas sem consequências maiores. O sangue doado será utilizado nessa pesquisa e comparado com o de pessoas que não possuem a doença. A quantidade de sangue coletada será suficiente para a pesquisa, mas, caso sobre algum material, este será estocado e poderá ser usado em projetos futuros, lembrando que se isso ocorrer, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será encaminhado, podendo você aceitar ou não participar.

Tendo sido satisfatoriamente informado (a) sobre o projeto acima, sob a responsabilidade da Biomédica Laura Denise Mendes da Silva e da bióloga Profa Dra Sueli Aparecida Calvi, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, declaro que concordo em participar do mesmo. Estou ciente de que os resultados dos exames serão utilizados somente pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estão disponíveis para responder a quaisquer perguntas. Sei ainda, que **poderei retirar este consentimento a qualquer tempo, sem que isso resulte em prejuízo para meu seguimento, atual ou futuro, em qualquer dependência do Hospital das Clínicas da UNESP.** Em caso de dúvida adicional, sei que poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, através do fone: 3880-1608/3880-1609.

Este documento após aprovação do CEP será elaborado em 2 vias, sendo uma entregue ao sujeito da pesquisa e outra será mantida em arquivo pelo pesquisador.

Declaro que o presente projeto de pesquisa foi explicado em detalhes ao Sr(a) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.

Botucatu, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

Sueli Aparecida Calvi CRBIO:20086/01  
End: Rua Fausto Lyra Brandão, 211, Vila Nogueira, Botucatu  
Tel: 14 97758841; E-mail: [sacalvi@fmb.unesp.br](mailto:sacalvi@fmb.unesp.br)

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pesquisadora

Laura Denise Mendes da Silva CRBM: 10240  
End: R.Dr Ranimiro Lotufo,359, Vila Sônia, Botucatu  
Tel: 14 9740-6978; E-mail :laurabiomedicina@gmail.com

## ANEXO 4



## UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA

Departamento de Doenças Tropicais

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

A doença de Chagas é causada por um protozoário o qual é transmitido pela picada de um inseto chamado barbeiro. Quando o sistema imune do paciente entra em contato com esse parasita, são ativados alguns receptores celulares, chamados Toll-like, os quais são responsáveis por produzirem certas substâncias, chamadas citocinas. Essas citocinas estão ligadas à reação do sistema de defesa da pessoa contribuindo para a morte do parasita ou para sua sobrevivência. No Hospital das Clínicas da UNESP, será realizada a pesquisa, denominada **“Papel dos receptores TLR-2 e TLR-4 na produção de citocinas em pacientes chagásicos crônicos”** na qual serão dosadas as citocinas e os receptores celulares (Toll-like). Essa pesquisa permitirá detectar possíveis diferenças na resposta imune desses pacientes.

Por isso, estamos convidando você, sem nenhuma obrigação a contribuir para nossa pesquisa, doando 20 ml de sangue. A coleta será feita por profissional devidamente capacitado e com material estéril, no dia da doação de sangue no Hemocentro de Botucatu. No dia da coleta pode ocorrer um leve incômodo no braço, mas sem maiores consequências. O sangue doado será utilizado nessa pesquisa e comparado na mesma com o de pessoas que possuem a doença. A quantidade de sangue coletada será suficiente para a pesquisa, mas, caso sobre algum material, este será estocado e poderá ser usado em projetos futuros, lembrando que se isso ocorrer, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será encaminhado, podendo você aceitar ou não participar.

Tendo sido satisfatoriamente informado (a) sobre o projeto acima, sob a responsabilidade da Biomédica Laura Denise Mendes da Silva e da Bióloga Profa Dra Sueli Aparecida Calvi, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, declaro que concordo em participar do mesmo. Estou ciente de que os resultados dos exames serão utilizados somente pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estão disponíveis para responder a quaisquer perguntas. Sei ainda, que **poderei retirar este consentimento a qualquer tempo, sem que isso resulte em prejuízo para meu seguimento, atual ou futuro, em qualquer dependência do Hospital das Clínicas da UNESP.** Em caso de dúvida adicional, sei que poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, através do fone: 3880-1606/3880-1609.

Declaro que o presente projeto de pesquisa foi explicado em detalhes ao Sr(a) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.

Botucatu, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pesquisadora

Sueli Aparecida Calvi CRBIO:20086/01  
End: Rua Fausto Lyra Brandão, 211, Vila Nogueira, Botucatu  
Tel: 14 97758841; E-mail: [sacalvi@fmb.unesp.br](mailto:sacalvi@fmb.unesp.br)

Laura Denise Mendes da Silva CRBM: 10240  
End: Rua Dr Ranimiro Lotufo, 359, Vila Sônia, Botucatu  
Tel: 14 9740-6978; E-mail :laurabiomedicina@gmail.com

## ANEXO 5



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



## MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA\*

**Objetivo Acadêmico:** Dissertação de Mestrado

Título constante no parecer inicial de aprovação:

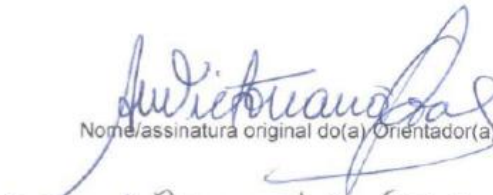
Papel dos TLR2 e TLR4 na produção de citocinas em pacientes chagásicos crônicos.

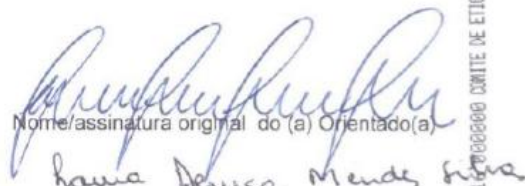
Título final:

Papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de citocinas em pacientes chagásicos crônicos.

Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial: 01/04/13

Declaramos que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

  
Nome/assinatura original do(a) Orientador(a)  
Angela Maria V. C. Soares

  
Nome/assinatura original do(a) Orientado(a)  
Larissa Denise Mendes Silva

\* Projetos submetidos via Plataforma Brasil: preencher o formulário, digitalizar e postar sistema plataforma brasil (vide instruções contidas no Of. 06/2014-CEP); a seguir, imprimir "print screen" da tela comprovando o aceite pelo CEP da solicitação de alteração;

\* Projetos submetidos anteriormente a Plataforma Brasil: preencher o formulário em duas vias e protocolar no CEP que emitiu o Parecer inicial de aprovação