



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

DIEGO JOSÉ LIRA TORRES

**AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES DE TNF- α NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA**

Recife
2019

DIEGO JOSÉ LIRA TORRES

**AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES DE TNF- α NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como critério para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientador: Dr^a. Virgínia Maria Barros de Lorena.

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

T693a Torres, Diego José Lira.
Avaliação dos receptores de TNF - α na cardiopatia chagásica crônica / Diego José Lira Torres. – Recife: o autor, 2019.
87 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Virgínia Maria Barros de Lorena.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical.
Inclui referências e anexos.

1. Receptores do fator de necrose tumoral. 2. Fator de necrose tumoral alfa.
3. Cardiomiopatia chagásica. 4. Doença de Chagas. I. Lorena, Virgínia Maria Barros de (orientadora). II. Título.

616.988 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 063)

DIEGO JOSÉ LIRA TORRES

**AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES DE TNF- α NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA
CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 15/02/2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Vlúdia Maria Assis Costa (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Ana Karine de Araújo Soares (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Marina Cadena da Matta (Examinadora Externa)
Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP)

Dedico essa dissertação à Deus que nunca me deixou que faltasse fé. Aos portadores da doença de Chagas pela participação no estudo. À minha mãe: Edna Lira, na qual me espelho pela força de vontade e alegria de viver e à minha família pelo suporte e pelas palavras de incentivo em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edna Lira e Ediomésio que sempre fazem tudo que podem para que seus filhos consigam algo na vida. Ao meu pai pela paciência e honestidade ao longo desses anos. À minha mãe Edna pela alegria de sempre, pela mulher batalhadora que és. Saiba que tudo que farei será por vocês, pois são meu tesouro e minha felicidade.

À minha querida irmã Ana Karina, minha “ina” pela convivência, pelas confissões, por sempre deixar meus dias mais leves e por sempre me ensinar a ser alguém melhor. Ina, saiba que seria muito difícil isso tudo sem você comigo. Conte comigo sempre.

À minha noiva, Aline, que desde a graduação tem se dedicado intensamente no nosso crescimento e relacionamento. Passamos por vários momentos juntos, passamos tantas dificuldades na faculdade. No mestrado, não poderia ser diferente. É sempre ela que está ao meu lado quando eu mais preciso, é sempre ela que sabe todos os meus anseios e que sempre tenta deixar tudo mais leve. Te amo muito e quero você para sempre na minha vida.

À minha família por todo suporte, pela base e carinho. Serei imensamente grato a minha querida tia Francisca por toda a ajuda e bondade. Não posso deixar de agradecer aos meus tios Neuman, Maria, Elza, Eva e Neto. À minha avó Joana pelas palavras e sabedoria.

Aos meus tios Edilson e Edvania (Nem) por todo suporte, pelas conversas e pelas visitas à Recife. À “Totoca” e à tia Eliete pelo carinho.

Quero agradecer também a família da minha noiva: Juliana, Gilmo, Andreia, Jailson, Dona Santa, Juh e Daniel por toda receptividade, carinho e consciência nos momentos que precisei me ausentar.

À queridíssima Jesus pelas oportunidades e conselhos profissionais.

Aos meus queridos amigos Jordy, Marlos, Adriana e Ana Luiza pela verdadeira amizade, pelos bons papos, pelos conselhos, pelos shows e baladas. Tenham certeza que sempre vou precisar de todos vocês e que nossa amizade será eterna.

A todos os amigos que fiz durante esse tempo de Fiocruz, em especial Neide, Marcela, Yury e Débora. Nossos grupos de whatsapp deixaram meus dias mais leves. Neide obrigado pelos seus áudios. “Debis” você se tornou uma grande amiga,

te agradeço por toda ajuda, pelas preocupações, nunca vou esquecer das nossas caminhadas até o ponto de ônibus e das longas histórias e risos compartilhados.

À Juh Gonçalves pelas dicas e ajudas em períodos conturbados de seleções, por me escutar e orientar da melhor maneira. Juh, nossa amizade será eterna.

Ao LIMP pela recepção logo quando cheguei pela primeira vez no laboratório, pelas brincadeiras que amenizavam o clima tenso em dias de experimentos. Em especial à Raffa Lira, Athos, Thaynan, Jô, Lucas Portela e Kamila.

Aos colegas de turma do mestrado por compartilharmos todo apertado das disciplinas, seminários e provas. Em especial à Pry, Regina Athalys, Regina Coeli, Danylo, Ayana, Andreia, Conceição, Kaliene, Glauco e Roberto. E também aos colegas de outros programas, Lais Baracho e Leyde, que tive a honra de fazer colaboração.

Ao grupo Chagas, em especial ao grande Mineo Nakazawa pelas palavras carinhosas de incentivo, pelas ajudas nos experimentos e que sempre nos acalma quando mais precisamos. À Mih, Leylla, Kamila Kássia, Amandinha e Karine pelo companheirismo durante a realização de experimentos, reuniões científicas, faxinas do lab e participação em congressos. Não posso deixar de agradecer ao meu companheiro de mestrado e de experimentos: Tiago. Amigos, obrigado pelas brincadeiras, pelo companheirismo e pela ajuda de sempre.

Não posso deixar de agradecer à pessoa que fez tudo isso acontecer, à minha querida orientadora Virginia Lorena. Vi, jamais esquecerei tudo que você fez e faz por mim. Jamais irei esquecer as frases de incentivo nos períodos conturbados que passei desde o TCC, seleções e bancas. Só tenho a agradecer. Você é a melhor orientadora do mundo. Conte comigo sempre!

À FIOCRUZ pela infra estrutura laboratorial e à CAPES pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço aos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho. Ciência não se faz sozinho.

Agradeço profundamente aos que torcem quando ganho e choram quando perco.

VOCÊS FORAM, SÃO E SERÃO ESSENCIAIS. SEM VOCÊS NÃO SOU
NADA!

“Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança.”
(HAWKING, 2006)

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta mais de 8 milhões de pessoas ao redor do mundo. Tem grande impacto na morbimortalidade quando comparada a qualquer outra doença parasitária devido às diferentes manifestações clínicas apresentadas, levando a 10.000 mortes anuais em países da América Latina. No Brasil, a infecção pela via oral tem provocado surtos agudos, principalmente na região Norte, alertando para a implementação de medidas sanitárias urgentes constituindo um grave problema de saúde pública. A fase crônica da doença é caracterizada pela forma indeterminada (IND), forma cardíaca (CARD), digestiva e mista. A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a forma mais grave da doença, pois afeta extensamente o coração levando a fibrose com conseqüente perda da função contrátil. Acredita-se que a resposta imune tenha papel central na evolução das formas clínicas em portadores crônicos da doença de Chagas. O TNF- α , a citocina mais pleiotrópica do sistema imune, é uma citocina pró-inflamatória que tem papel relevante durante a infecção. Receptores solúveis de TNF- α (sTNFR1 e sTNFR2) são considerados potentes inibidores naturais endógenos do TNF- α e encontram-se elevados em muitas condições inflamatórias, autoimunes e crônicas. O objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis de TNF- α e de seus receptores no soro de portadores crônicos de doença de Chagas. Foram incluídos 133 pacientes, sendo 51 com a forma indeterminada (IND), 39 com a forma cardíaca leve (CARD 1) e 43 com a forma cardíaca grave (CARD 2), além de 20 indivíduos não infectados (NI). Os resultados apontam importante papel na regulação da atividade do TNF- α desempenhada pelos receptores solúveis. Os receptores sTNFR1 e sTNFR2 se elevam em pacientes com doença de Chagas quando comparado aos não infectados. Apesar de não haver diferença estatística entre os portadores crônicos, os níveis de sTNFR1 se elevam à medida que ocorre o agravamento da doença. Além disso, verificamos uma correlação negativa entre sTNFR1 e TNF- α em portadores da forma IND, sugerindo que essa relação pode impedir a progressão para formas mais graves, como a forma cardíaca. Não encontramos nenhuma diferença estatística significativa nos níveis de TNF- α , porém níveis mais baixos dessa citocina no grupo IND revelam características regulatórias dessa forma clínica. Contudo outras citocinas podem estar atuando em sinergia ou inibindo a atividade do TNF- α . Esses achados sugerem a importância no balanço

endógeno dos receptores solúveis de TNF- α , e indicam proteção e equilíbrio nos pacientes com doença de Chagas crônica.

Palavras-chave: Receptores do Fator de Necrose Tumoral. Fator de Necrose Tumoral alfa. Cardiomiopatia Chagásica. Doença de Chagas.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects more than 8 million people around the world. It has a great impact on morbidity and mortality when compared to any other parasitic disease due to the different clinical manifestations presented, leading to 10,000 annual deaths in Latin American countries. In Brazil, oral infections have caused acute outbreaks, especially in the North region, alerting to the implementation of urgent sanitary measures constituting a serious public health problem. The chronic phase of the disease is characterized by undetermined form (IND), cardiac (CARD), digestive and mixed form. Chronic chagasic cardiopathy (CCC) is the most severe form of the disease, as it affects the heart extensively leading to fibrosis with consequent loss of contractile function. It is believed that the immune response plays a central role in the evolution of clinical forms in chronic carriers of Chagas' disease. TNF- α , the most pleiotropic cytokine in the immune system, is a proinflammatory cytokine that plays a role during infection. Soluble TNF- α receptors (sTNFR1 and sTNFR2) are considered potent natural endogenous inhibitors of TNF- α and are elevated in many inflammatory, autoimmune and chronic conditions. The objective of the present study was to evaluate the levels of TNF- α and its receptors in the serum of chronic carriers of Chagas' disease. A total of 133 patients were included, of which 51 were undetermined (IND), 39 were mild (CARD 1) and 43 were severe cardiac (CARD 2), and 20 uninfected individuals (NI). The results point to an important role in the regulation of TNF- α activity performed by soluble receptors. The sTNFR1 and sTNFR2 receptors are elevated in patients with Chagas disease compared to uninfected. Although there is no statistical difference between the chronic carriers, sTNFR1 levels increase as the disease worsens. In addition, we found a negative correlation between sTNFR1 and TNF- α in IND individuals, suggesting that this relationship may prevent progression to more severe forms, such as cardiac form. We found no statistically significant difference in TNF- α levels, but lower levels of this cytokine in the IND group reveal regulatory characteristics of this clinical form. However, other cytokines may be acting synergistically or inhibiting TNF- α activity. These findings suggest the importance in endogenous balance of soluble TNF- α receptors and indicate protection and balance in patients with chronic Chagas' disease.

Keywords: Receptors, Tumor Necrosis Factor. Tumor Necrosis Factor-alpha. Chagas
Cardiomyopathy. Chagas Disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 –	Distribuição de casos estimados da doença de Chagas no mundo	19
Figura 2 –	Ciclo de transmissão vetorial do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3 –	Evolução da doença de Chagas nos portadores infectados	23
Figura 4 –	Principais achados na cardiopatia chagásica crônica	24
Figura 5 –	Resposta imunológica nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas humana	27
Figura 6 –	Processo de síntese de interação do TNF- α com TNFR ...	29

Metodologia

Tabela 1 –	Caracterização dos pacientes	38
------------	------------------------------------	----

Artigo

Tabela 1 –	Caracterização dos pacientes	46
Figura 1 –	Concentração de TNF e de seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) em soro de pacientes infectados e não infectados	48
Tabela 2 –	Correlação entre a concentração sorológica de sTNFR1/2 e TNF em portadores crônicos da doença de Chagas	49
Figura 2 –	Correlações entre as concentrações sorológicas de sTNFR1 e sTNFR2 em portadores crônicos da doença de Chagas	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, <i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BD	<i>Becton Dickinson</i>
CARD	Forma Cardíaca
CBA	<i>Citometric Beads Array</i>
CCC	Cardiopatia Chagásica Crônica
CD	Grupos de diferenciação, <i>Cluster of differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DC	Doença de Chagas
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
ELISA	Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPI	Epimastigota
FADD	Proteína associada a Fas com o domínio da morte, <i>Fas-Associated Protein With Death Domain</i>
FASL	Fas ligante, <i>Fas ligand</i>
FEVE	Fração de Ejeção Ventricular Esquerda
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FSC	Dispersão frontal, <i>Forward Scatter</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IND	Forma Indeterminada
iNOS	Óxido Nítrico-Sintase Induzida, <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
MIF	Intensidade Média de Fluorescência, <i>Mean Intensity of</i>

Fluorescence

mRNA	RNA Mensageiro, <i>Messenger RNA</i>
mTNF- α	TNF- α Transmembrana, <i>Transmembrane TNF-α</i>
NI	Não infectado
NK	Célula Assassina Natural, <i>Natural-Killer</i>
PBMC	Célula Mononuclear de Sangue Periférico, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PE	Ficoeritrina, <i>Phycoerythrin</i>
SRDC	Serviço de Referência em Doença de Chagas
SSC	Dispersão Lateral, <i>Side Scatter</i>
STNF	Fator de Necrose Tumoral solúvel, <i>Soluble Tumor Necrosis Factor</i>
STNFR	Receptor solúvel do fator de necrose tumoral, <i>Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors</i>
TA	Temperatura Ambiente
TACE	Enzima Conversora de TNF Alfa, <i>TNF Alpha Converting Enzyme</i>
TCLE	Termo de consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Linfócito T auxiliar 1, <i>T helper 1</i>
Th2	Linfócito T auxiliar 2, <i>T helper 2</i>
TNFRSF	Superfamília Do Receptor Do Fator De Necrose Tumoral, <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa, <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TNFR	Receptores do fator de necrose tumoral, <i>Tumor Necrosis Factor Receptors</i>
TRADD	Proteína do domínio de morte associada ao TNFR1, <i>TNFR1, Associated Death Domain Protein</i>
UPE	Universidade de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas	18
2.2	Ciclo Biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
2.3	Aspectos clínicos da doença de Chagas	21
2.4	Aspectos imunes da doença de Chagas	25
2.5	Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-α) e Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFRs)	28
2.5.1	Receptores de TNF- α na doença de Chagas	30
3	JUSTIFICATIVA	34
4	PERGUNTA CONDUTORA	35
5	OBJETIVOS	36
5.1	Objetivo geral	36
5.2	Objetivos específicos	36
6	MATERIAIS E MÉTODOS	37
6.1	População e local de estudo	37
6.2	Confirmação da sorologia para a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
6.3	Quantificação de receptores solúveis de TNF- α (sTNFR1 e sTNFR2) e TNF- α em amostras de soro por Cytometric Bead Array (CBA)	39
6.4	Análise estatística	40
7	RESULTADOS	42
7.1	Artigo 1 – Níveis de receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) estão elevados no soro de pacientes com doença de Chagas crônica	42
8	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE A – ARTIGO	69
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO NO CEP	87

1 INTRODUÇÃO

As citocinas se ligam a receptores específicos presentes em diversos tipos celulares. O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), uma das citocinas mais pleiotrópicas do sistema imune, tem sua função estabelecida pela ligação a dois receptores, o receptor do fator de necrose tumoral do tipo 1 e do tipo 2. Eles podem ser expressos nas membranas celulares (mTNFR1/2) e podem ser encontrados na forma solúvel (sTNFR1/2), sendo os solúveis potentes inibidores naturais da citocina (VAN ZEE *et al.*, 1992).

O receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) medeia a resistência do hospedeiro a vários agentes infecciosos levando a atividades microbidas de fagócitos além do impacto na indução de apoptose, crescimento e diferenciação celular (CASTAÑOS-VELEZ *et al.*, 1998). Em altas concentrações, os receptores solúveis inibem a bioatividade do TNF- α por competir com os receptores presentes na membrana das células. Em baixas concentrações, eles podem estabilizar a estrutura da citocina, aumentando seu tempo de meia-vida e agindo como um reservatório de TNF- α (DEROUICH-GUERGOUR *et al.*, 2001).

Os estudos *in vivo* revelam que a via TNF/TNFR1 é primordial para o controle parasitário, equilíbrio imunológico, caquexia e sobrevida em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* (ALIBERTI *et al.*, 2001; CASTAÑOS-VELEZ *et al.*, 1998; KROLL-PALHARES *et al.*, 2008; PÉREZ *et al.*, 2007, 2017; VILLAR *et al.*, 2013). sTNFR1/2 são importantes no equilíbrio endógeno da ação do TNF- α , onde o desequilíbrio dessas moléculas foi associado a piora em camundongos infectados pelo *T. cruzi* (TRUYENS *et al.*, 1999).

Em humanos os níveis de TNF- α estão correlacionados diretamente com o grau de disfunção cardíaca em portadores da cardiopatia chagásica quando comparados a portadores da forma indeterminada e indivíduos sem a doença (FERREIRA *et al.*, 2003; TALVANI *et al.*, 2004), sugerindo um perfil pró-inflamatório e consequente ação deletéria desta citocina. Portanto, a avaliação dos receptores solúveis em humanos pode auxiliar o entendimento da imunorregulação da doença de Chagas.

González *et al.* (2018) verificaram que os níveis de TNFR2 foi maior em células de sangue periférico de portadores com a forma indeterminada e cardíaca da doença de Chagas quando comparada aos indivíduos não infectados. Os autores

não encontraram diferença estatística significativa de níveis plasmáticos de TNF- α e TNFR1 em portadores crônicos ou quando comparado aos controles. Mocelin *et al.* (2005) não encontraram nenhuma diferença estatística nos níveis plasmáticos de sTNFR1 entre portadores crônicos da doença de Chagas e indivíduos do grupo controle. Apenas em pacientes com cardiopatia idiopática dilatada. Além disso, nenhuma associação foi feita entre esse receptor com eventos clínicos (morte e transplante cardíaco). O pequeno número de pacientes (28) e a técnica utilizada pelos autores podem ter sido vieses para o estudo (GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Diante do exposto, a avaliação dos receptores e seu ligante em portadores que apresentam a forma cardíaca da doença em comparação com a forma indeterminada da doença de Chagas humana, auxiliará no entendimento de como esses receptores agem cronicamente e dependendo da quantidade no soro, poderiam tornar-se biomarcadores inflamatórios de gravidade ou ainda serem utilizados como potenciais alvos terapêuticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas

Dentre as 13 doenças mais negligenciadas do mundo estão as doenças tropicais causadas por protozoários (HOTEZ *et al.*, 2008; WHO, 2013). As enfermidades causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae*, que são as Leishmanioses e a Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas, configuram grande impacto na expectativa de vida da população e afeta indivíduos com potencial produtivo, sobretudo em países subdesenvolvidos, tendo impacto considerável na morbidade e mortalidade (HOTEZ *et al.*, 2008; WHO, 2019).

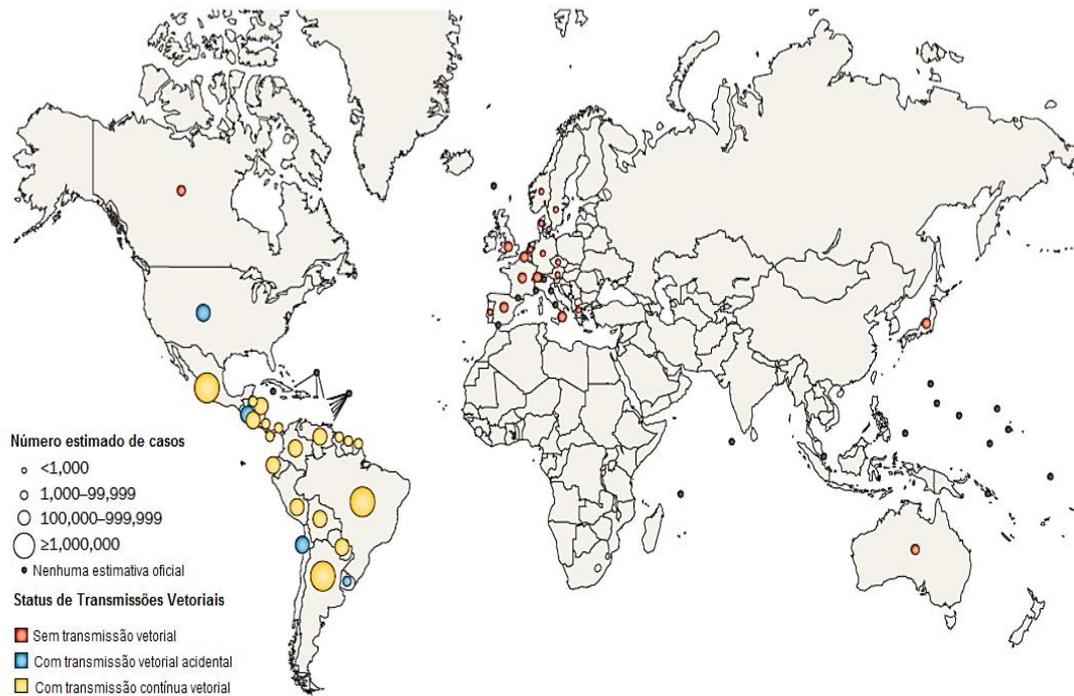
A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* tem maior influência na morbimortalidade nas Américas quando comparada a outras doenças parasitárias (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Habitualmente é confinada a áreas rurais pobres da América Central e do Sul, onde a transmissão vetorial, por várias espécies de triatomíneos, é a principal via de contaminação. Mas existem outras formas de transmissão que não necessariamente dependem diretamente do vetor. Sendo estas mais relatadas em regiões não endêmicas como o aumento da migração, transfusão de sangue, transplante de órgãos e transmissão vertical (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; DIAS; AMATO NETO, 2011; MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015; NÓBREGA *et al.*, 2009; PEREZ-MOLINA; MOLINA, 2017).

A infecção tem se tornado um desafio mundial pela migração de pessoas de países endêmicos para áreas não endêmicas, afetando mais de 8 milhões de pessoas ao redor do mundo, como: Estados Unidos, Austrália, Japão e países da Europa (SCHMUNIS; YADON, 2010; WHO, 2019). Afeta endemicamente 21 países da América Latina, desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina e do Chile, onde a Bolívia e Brasil tem a maior taxa de prevalência, e constitui um dos grandes problemas de saúde pública por causar mais de 10.000 mortes anuais, superando os casos de malária (WHO, 2019). Além disso, aproximadamente 70 milhões de pessoas estão sob risco de infecção (BILBE, 2015; WHO, 2013).

No Brasil a infecção por via oral tem sido a principal via de contaminação e tem provocado surtos agudos, principalmente na região Norte (1156 casos) e Nordeste (24 casos), totalizando 1190 casos de doença de Chagas aguda no país

entre 2012 a 2016, alertando para a implementação de medidas sanitárias urgentes (BRASIL, 2019).

Figura 1 Distribuição de casos estimados da doença de Chagas no mundo.



Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al.* (2012).

Apesar de mais de um século de sua descoberta, muitos aspectos permanecem obscuros e podem estar longe de serem elucidados pela extrema heterogeneidade da doença como tempo de evolução e período de incubação, reconhecimento insatisfatório de mortalidade, dados limitados sobre sequelas e ausência de dados fora dos países endêmicos (PINHEIRO *et al.*, 2017). A falha no diagnóstico, ausência de biomarcadores de evolução clínica e principalmente drogas mais eficientes para o tratamento refletem o quão negligenciada e grave problema de saúde pública mundial é a doença de Chagas (STANAWAY; ROTH, 2015).

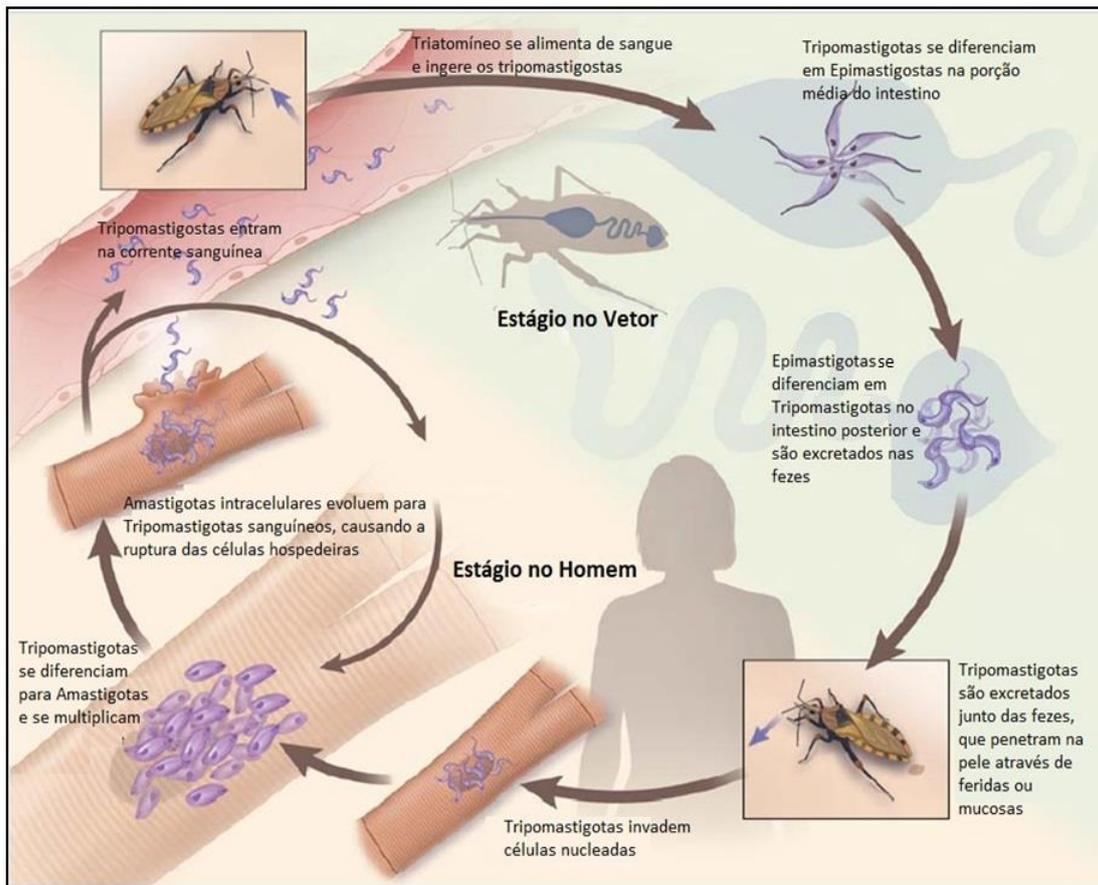
2.2 Ciclo Biológico do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário que possui ciclo biológico heteroxênico vivendo em hospedeiros vertebrados: o homem e mais de 150 espécies de mamíferos, assumindo ciclos silvestres e domésticos. Nos hospedeiros invertebrados, infecta diversas espécies de insetos hematófagos, com espécies de maior competência vetorial o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* responsáveis pela transmissão vetorial em áreas endêmicas (ARGOLO *et al.*, 2008; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; SCHMUNIS; YADON, 2010).

Para o sucesso da infecção, há alguns importantes fatores no elo vetor, protozoário e humano que podem variar de espécie para espécie como intervalo da picada do triatomíneo; a eliminação das excretas contaminadas pelo parasito; número de parasitas nas fezes e intensidade do prurido (COURA, 2007). Os triatomíneos se infectam, quando ao fazer o repasto sanguíneo em animais ou humanos infectados, ingerem formas tripomastigotas circulantes, que se transformam em epimastigotas para se multiplicarem, e em tripomastigotas metacíclicos (forma infectante) novamente, na porção final do tubo digestivo desses insetos vetores (Figura 2) (BERN, 2015; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

A contaminação humana pelo vetor ocorre quando o triatomíneo infectado ao fazer o repasto sanguíneo, elimina excretas próximo ao local da picada. Nas fezes e/ou urina encontra-se a forma tripomastigota metacíclica que ganha o acesso sistêmico quando o indivíduo fricciona o local da picada podendo parasitar várias células, iniciando um novo ciclo de replicação (ARGOLO *et al.*, 2008; BERN, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2006). No interior das células o tripomastigota involui para a fase amastigota, que é a forma replicante do parasita (Figura 2).

Figura 2 Ciclo de transmissão vetorial do *Trypasonoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de Bern (2015).

2.3 Aspectos Clínicos da doença de Chagas

A doença de Chagas é categorizada de acordo com os aspectos clínicos e laboratoriais em fases aguda e crônica (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

O período de incubação pode variar de acordo com a forma de contágio, variando de 20 a 40 dias pelo contágio com hemoderivados contaminados, 7 a 15 dias para transmissão vetorial e 2 a 22 dias para infecção oral (BOCCHI *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2015).

Alguns sinais clínicos relacionados à transmissão vetorial são evidentes e fortes indicadores de infecção aguda na doença, como o sinal de Romaña, que indica contaminação pela mucosa ocular e chagoma de inoculação que indica contaminação pela pele, onde o local fica edemaciado. Além dos sinais e sintomas gerais, como febre, aumento de baço, fígado e linfonodos, outras manifestações,

mais raras, podem acometer os indivíduos e levar ao óbito como meningoencefalia e/ou insuficiência cardíaca caracterizando uma doença aguda grave (MATTU *et al.*, 2013; RASSI; RASSI; MARCONDE DE REZENDE, 2012; RASSI; RASSI; MARINETTO, 2010).

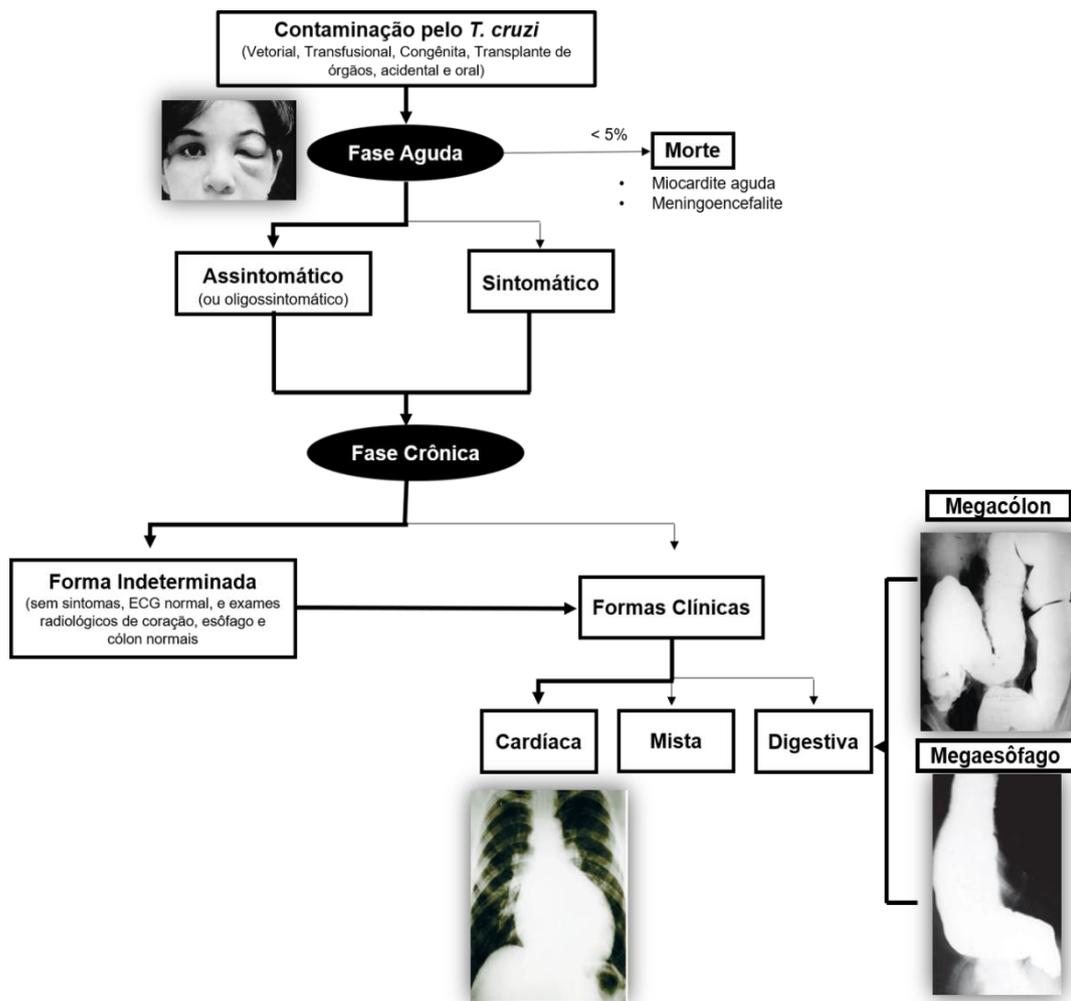
Apesar de o Brasil ter recebido a certificação de eliminação vetorial em 2006 pela Organização Mundial da Saúde, a manifestação aguda pela transmissão vetorial decresceu, porém, contaminação pela via oral, reagudização da doença em pessoas vivendo com HIV/AIDS ou que fazem uso de imunossupressores repercute em quadro agudo grave com grande impacto na morbimortalidade (BERN; MARTIN; GILMAN, 2011).

A fase aguda na maioria dos indivíduos é assintomática e cursa com parasitemia no início da infecção. A sintomatologia é relacionada a carga parasitária, uma vez que nos indivíduos que se contaminam oralmente pela ingestão de alimentos contaminados com fezes de barbeiros infectados, o índice de mortalidade e sintomas é alto devido a elevada carga parasitária, implicando numa fase crônica mais grave (DIAS, 1982).

A fase crônica, iniciada após quatro a dez semanas, da doença é responsável pela maior parte das consequências clínico-patológicas do portador e é caracterizada pelo intenso infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares, graus de fibrose e persistência do parasita, este último podendo culminar em doença grave, pois como consequência leva a disfunção vascular e/ou neurológica (MACHADO *et al.*, 2012a; RIBEIRO *et al.*, 2012). Além de desencadear resposta imune adaptativa, importante no controle parasitário.

As formas clínicas da doença de Chagas crônica se dividem em forma assintomática, conhecida também como forma indeterminada responsável pela maioria dos casos (aproximadamente 60% dos infectados). Forma sintomática na qual, o indivíduo apresenta manifestações relacionadas com o coração (forma cardíaca) (30% dos infectados) e/ou esôfago e cólon (forma digestiva e/ou mista) e sistema nervoso central e periférico (raro) (DIAS *et al.*, 2016) (Figura 3).

Figura 3. Evolução da doença de Chagas nos portadores infectados.



Fonte: Adaptado de Rassi, Rassi e Rassi (2007) e Rassi *et al.* (2017). Nota: As setas em negrito significam uma maior probabilidade de evolução

Na forma indeterminada (IND) o portador tem as mesmas expectativas de vida de uma pessoa sem a doença. Esses indivíduos apresentam testes sorológicos reagentes, mas possuem exames de imagem normais e ausência de sintomas clínicos (DIAS *et al.*, 2016; RIBEIRO; ROCHA, 1998; WHO, 2015).

A forma digestiva é representada por alterações na motilidade e absorção do esôfago e trato gastrointestinal (RASSI *et al.*, 2017). Essas alterações são devido à perda neuronal que varia em graus e repercute no não fechamento dos esfíncteres que resulta em acúmulo de alimento e dilatação (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

A cardiopatia chagásica crônica (CCC) é definida como uma miocardiopatia dilatada relacionada à extensa fibrose e que resulta na progressiva perda de função

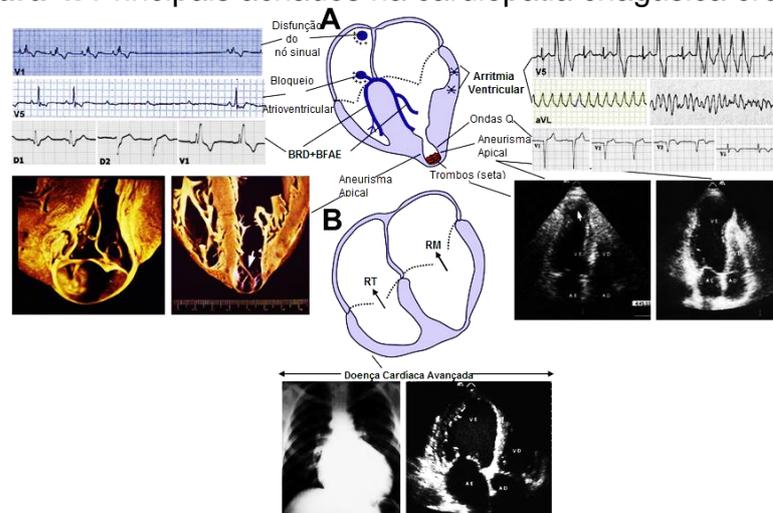
contrátil do órgão, podendo culminar com insuficiência cardíaca (DIAS *et al.*, 2016; MARIN-NETO *et al.*, 2007; RICHARDSON *et al.*, 1996).

Existem vários mecanismos que podem contribuir para a patogênese cardíaca como a disautonomia cardíaca, que é um funcionamento inadequado do sistema nervoso autônomo relacionado à perda neuronal, a hipótese microvascular, mecanismos imunopatológicos e persistência do parasita sendo os dois últimos mais bem aceitos (CASTRO *et al.*, 2011).

A forma cardíaca é a manifestação crônica mais grave e a maior responsável pela mortalidade na doença (RASSI; RASSI; LITTLE, 2000). Geralmente os principais achados, que podem coexistir no mesmo paciente, incluem anormalidades no sistema de condução, bradiarritmias, taquiarritmias, aneurismas apical, insuficiência cardíaca e morte súbita que dependerá do dano do miocárdio (Figura 4) (RASSI *et al.*, 2017; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

O *T. cruzi* promove, direta ou indiretamente, danos no tecido especializado de condução, miocárdio contrátil e no sistema nervoso intramural levando a inflamação, necrose e fibrose com repercussão hemodinâmica e cardiovascular (CASTRO *et al.*, 2011). Além disso, o intenso infiltrado inflamatório frente ao parasita contribui para sua diminuição tanto a nível sistêmico quanto a nível tecidual. Porém devido à persistência do parasita na fase crônica, uma resposta imune celular é montada levando a exaustivo dano tecidual sem reparos (GUTIERREZ *et al.*, 2009).

Figura 4. Principais achados na cardiopatia chagásica crônica.



Fonte: Adaptado de Rassi, Rassi e Marcondes de Rezende (2012). Nota: BRD – Bloqueio do Ramo Direito. BFAE – Bloqueio Fascicular Anterior Esquerdo. RT- Regurgitação Tricúspide. RM- Regurgitação Mitral.

A CCC é classificada em estágios, A, B, C e D de envolvimento cardíaco, de acordo com a I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2011). O estágio A (ou seja, sem cardiopatia) descartadas as alterações digestivas, corresponde a forma indeterminada, com eletrocardiograma (ECG) e ecocardiograma (ECO) normais além de ausência de insuficiência cardíaca. O estágio B é subdividido em B1 e B2, onde em B1 o indivíduo apresenta alterações no ECG e percentual da fração de ejeção ventricular esquerda (%FEVE) acima de 45% apresentada no ECO o que difere do paciente B2 que apresenta %FEVE menor que 45%. O paciente pertencente ao grupo C e D já apresentam insuficiência cardíaca, com sintomas prévios ou atuais (CASTRO *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2015).

Não se sabe ao certo quais os mecanismos envolvidos na evolução do portador da forma indeterminada para a forma sintomática, podendo durar décadas para que o indivíduo tenha os sinais e sintomas dessa fase. Dessa forma os indicadores clínicos ou sorológicos em pacientes que progridem para a fase determinada da doença (por exemplo, sintomáticos e muitas vezes fatais) permanecem pouco claros (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015). No entanto, manifestações da fase crônica, se presente, persistem, e em alguns pacientes se tornam mais graves com o tempo. Não há marcadores laboratoriais bem definidos, características do paciente ou medidas clínicas que predizem de forma confiável a progressão da doença de Chagas (RASSI *et al.*, 2017).

2.4 Aspectos imunes da doença de Chagas

A resposta imunológica frente ao protozoário é complexa, sendo desenvolvida durante a infecção e acompanha cronicamente a doença por toda a vida do hospedeiro levando à destruição tecidual e fibrose causada nos órgãos dos portadores.

Os estudos em modelos animais foram essenciais e contribuíram com achados relevantes acerca da imunologia na doença de Chagas, principalmente na fase aguda, contudo vários aspectos como o evento desencadeador, ainda não são claros no estudo imunológico na doença humana (BRENER; GAZZINELLI, 1997; DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2009).

O sistema complemento não tem uma grande eficácia durante a resposta imune inicial frente ao *T. cruzi*, apenas epimastigotas ou tripomastigotas de algumas cepas, são capazes de iniciar as vias alternativas e das lectinas. Essa falta de ativação das outras vias do complemento são devido as diferentes moléculas que o parasita apresenta, e dessa forma inibem a ativação do sistema complemento funcionando como mecanismos de escape (LIDANI et al., 2017; RAMÍREZ-TOLOZA; FERREIRA, 2017).

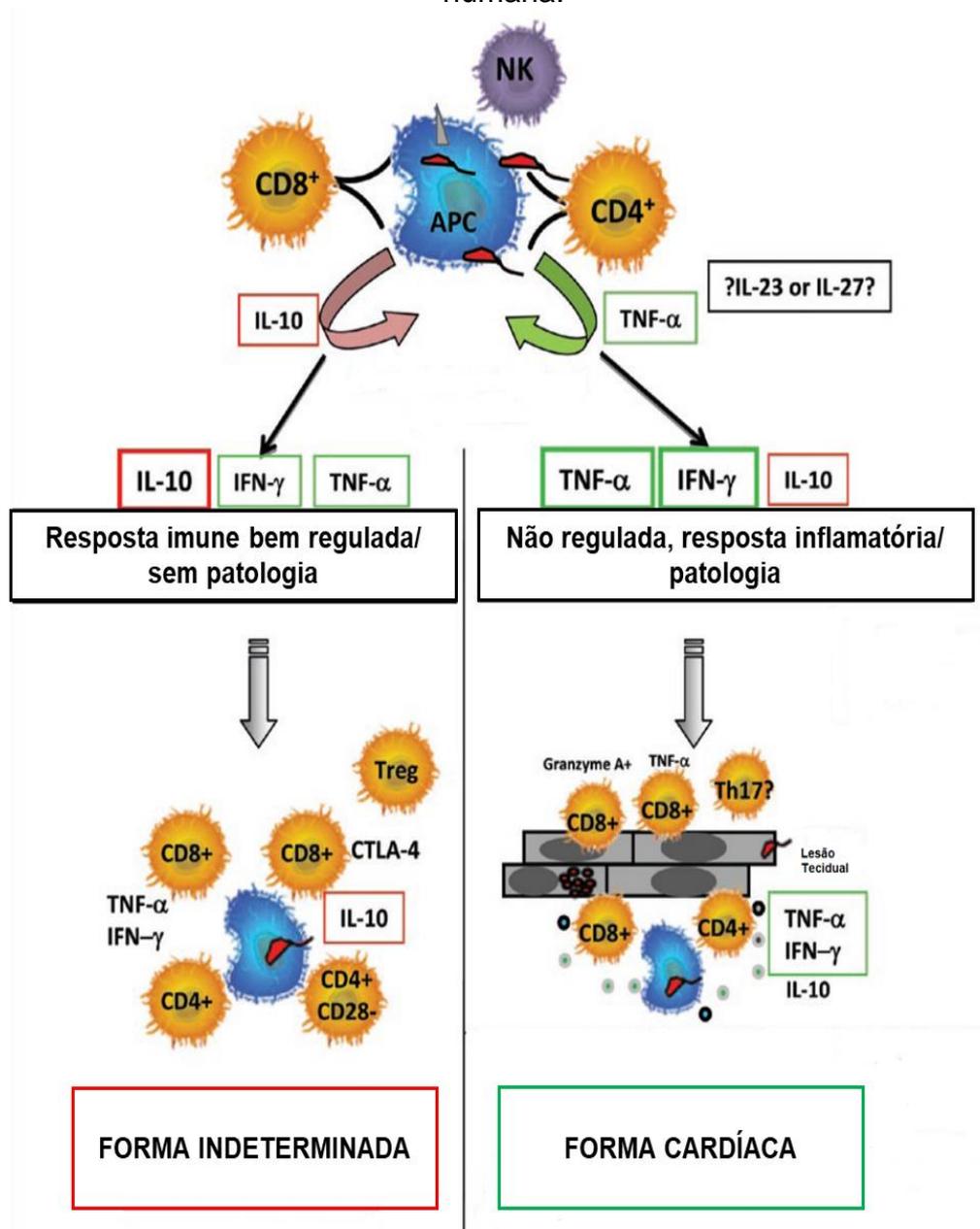
Desde a fase inicial da doença, quando o contágio é feito de forma vetorial, a resposta imunológica tem grande importância em nível sistêmico e tecidual. Há um intenso infiltrado inflamatório no local do contágio vetorial para defesa contra as amastigotas, principalmente por meio de macrófagos. Mas, a nível sistêmico o *T. cruzi* inicia mecanismos imunes humorais e celulares pela produção de anticorpos, células NK e linfócitos T que desempenham importância no controle do parasito em estágios iniciais da infecção em humanos e desta forma, ao final da fase aguda tem-se diminuição da parasitemia (GRAUERT; HOUDAYER; HONTEBEYRIE-JOSKOWCIZ, 1993; MACHADO et al., 2012b).

As células apresentadoras de antígenos apresentam os antígenos do *T. cruzi* aos linfócitos T. Os linfócitos TCD4+ juntamente com monócitos/macrófagos são consideradas as células responsáveis por iniciar e formar a resposta imune na doença de Chagas crônica humana (MACHADO et al., 2012b). As citocinas produzidas pelos linfócitos ativados desempenham papel importante na regulação da resposta imune e são implicadas na resistência a infecção e evolução da doença de Chagas (BRODSKYN; BARRAL-NETO, 2000). Estudos em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) revelam que após estímulo derivados do parasita, *in vitro*, há produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias e o perfil de citocinas produzido pelas células está relacionado com as formas clínicas da doença (CUELLAR et al., 2008; DUTRA et al., 1997; GOMES et al., 2003; SOUZA et al., 2004, 2007).

As análises de perfis de citocinas pró e anti-inflamatório sugerem que a IL-10 está mais elevada em indivíduos com a forma IND quando comparada aos da forma CARD, sugerindo que esta citocina esteja controlando a morbidade da doença por impedir a progressão para as formas clínicas sintomáticas (ARAÚJO et al., 2011; COSTA et al., 2009; GOMES et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2012; SOUZA et al., 2004).

Em contrapartida, citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α estão em níveis mais elevados em portadores da forma cardíaca e possivelmente, representam piora da função cardíaca. Além disso, níveis elevados de TNF- α estavam presentes em indivíduos portadores da cardiopatia que foram a óbito por acidente vascular cerebral (AVC), sugerindo que níveis elevados de TNF- α aumenta o risco de desenvolvimento de AVC (GUEDES *et al.*, 2016; TALVANI *et al.*, 2004) (Figura 5).

Figura 5. Resposta imunológica nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas humana.



Fonte: Adaptado de Dutra *et al.* (2009).

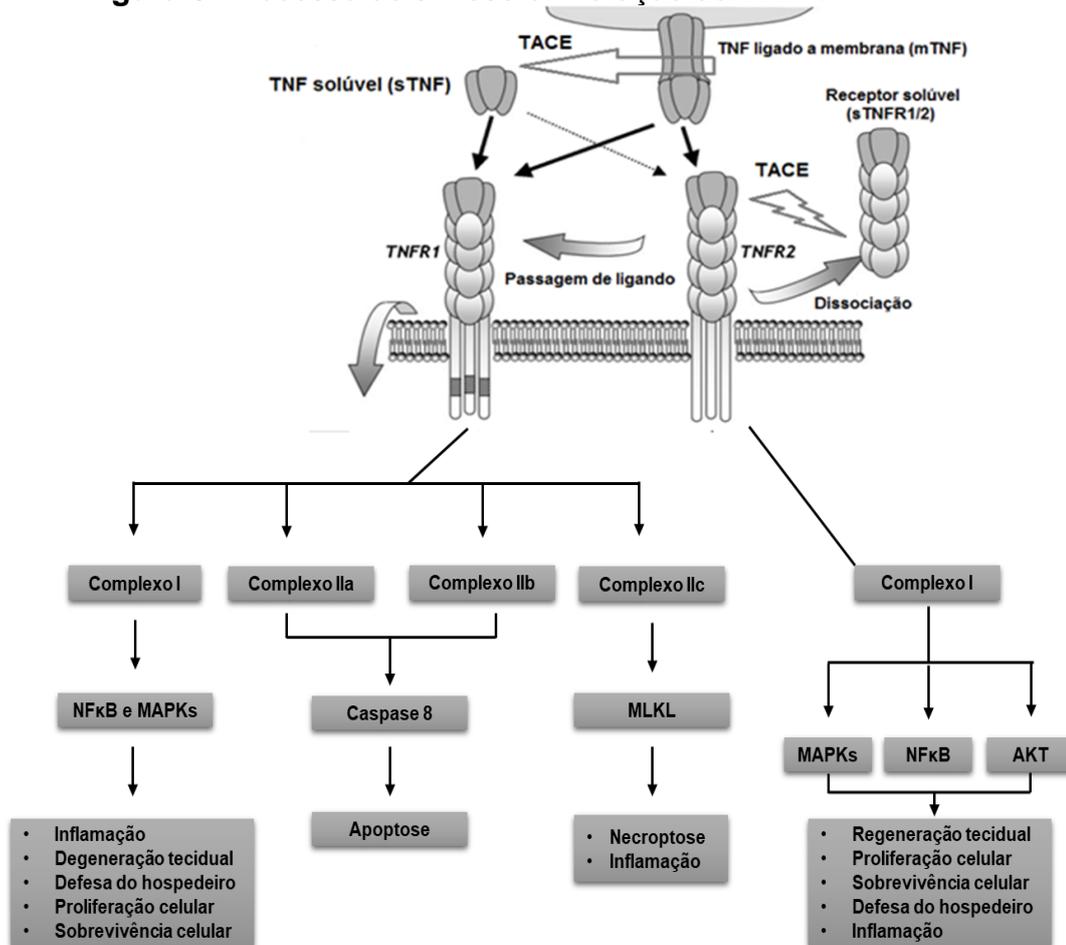
Assim, indivíduos que apresentam a forma cardíaca expressam níveis exacerbados de linfócitos do perfil pró-inflamatório, Th1, com consequente atenuação de uma resposta anti-inflamatória, representada pelo perfil de linfócitos Th2. Esse desequilíbrio revela a complexidade da resposta imune contra o *T. cruzi* e sugere que os focos inflamatórios incessantes, característicos da doença crônica, repercutem a produção plasmática de células e citocinas (CUNHA-NETO *et al.*, 2005).

2.5 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNFRs)

O TNF- α foi descrito em 1973 como uma endotoxina que causava necrose em tumores *in vitro* (CARSWELL *et al.*, 1975). É altamente inflamatório e considerado a citocina mais pleiotrópica, ou seja, desempenha funções em diversos tipos celulares. Seu papel é associado a várias patologias infecto parasitárias, autoimunes, neoplásicas e inflamatórias (SEDGER; MCDERMOTT, 2014). O TNF- α é resultado de uma clivagem da enzima conversora de TNF- α (TACE) sendo expressa inicialmente como uma proteína transmembrana em diversas células imunológicas como monócitos/macrófagos, células NK e linfócitos T, além de células endoteliais e fibroblastos (ISSUREE *et al.*, 2013; TSAI *et al.*, 1996).

Para esta citocina realizar suas várias funções, incluindo citotoxicidade e resposta frente a vírus e protozoários, eventos imunomoleculares complexos acontecem com a ligação aos receptores. Com a ação da enzima TACE, o TNF transmembrana (mTNF) é convertido a TNF solúvel (sTNF), que é a forma circulante com capacidade endócrina de agir em locais distantes (BLACK *et al.*, 1996; MOSS *et al.*, 1997; SEDGER; MCDERMOTT, 2014). O sTNF e o mTNF se ligam aos seus receptores transmembranares, os receptores de fator de necrose tumoral do tipo 1 (TNFR1 ou CD120a) e do tipo 2 (TNFR2 ou CD120b), onde o mTNF é um ligante mais potente para TNFR2, e o sTNF pelo TNFR1 (Figura 6).

Figura 6. Processo de síntese e interação do TNF- α com TNFR.



Fonte: Adaptado de MacEwan, (2002) e Kalliolias; Ivashkiv, (2015). Nota: TACE: Enzima Conversora de TNF- α . NF κ B: Fator nuclear κ B. MAPKs: Proteína quinase ativada por mitógeno. MLKL: Domínio de quinase de linhagem mista. AKT: Proteína quinase B.

O TNFR1 é encontrado constitutivamente na maioria das células, porém o TNFR2 tem expressão muito mais restrita à células imunes, tornando menos estudado quando comparado ao TNFR1 (CARPENTIER; COORNAERT; BEYAERT, 2004). Esses receptores também são clivados e se tornam receptores solúveis do tipo 1 e 2 (sTNFR 1/2) considerados potentes inibidores naturais de TNF- α , uma vez que são capazes de competir pelo sítio de ligação do TNF- α (VAN ZEE *et al.*, 1992).

Vários eventos moleculares e de transdução de sinais acontecem depois que ocorre a interação do ligante com os receptores, esses eventos são importantes para o TNF- α desempenhar todas as suas funções. O TNFR1 contém um domínio de morte em sua constituição e por isso quando ativado induz a morte celular, ao contrário do TNFR2 que não tem domínio de morte, mas pode induzir indiretamente

a morte celular via TNFR1, pelo mecanismo chamado “passagem do ligante” em que o TNF- α se liga ao TNFR1 (TARTAGLIA *et al.*, 1993a, 1993b).

Diversas doenças estão associadas ao TNFR1 e TNFR2 incluindo distúrbios metabólicos como diabetes mellitus do tipo 2. O TNFR1 induz a resistência à insulina mediada pela ligação ao TNF- α , pois o TNF- α age nos receptores de insulina (SALTIEL, 2001). Além disso, foi demonstrada uma correlação entre os receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) e distúrbios cardiovasculares associados com rigidez arterial podendo contribuir diretamente para arteriosclerose e insuficiência cardíaca (KIM *et al.*, 2016; SAFRANOW *et al.*, 2009). Por outro lado, a inibição do TNFR1 leva a atenuação da disfunção ventricular, entretanto a inibição do TNFR2 exacerba essa disfunção em camundongos (MONDEN *et al.*, 2007). Em estudos experimentais, a trombose arteriolar foi mais pronunciada em camundongos deficientes de TNFR1 (TNFR1^{-/-}) (PIRCHER *et al.*, 2012).

Park *et al.* (2017) mostraram que sTNFR1 não está associado a risco aumentado de doença cardiovascular em humanos, mas os autores não fizeram a mensuração do sTNFR2. Mesmo que esses estudos não estejam associados com infecção pelo *T. cruzi*, o seu papel em humanos é controverso necessitando de estudos mais detalhados.

2.5.1 Receptores de TNF- α na doença de Chagas

A ativação do TNFR1 parece ser extremamente importante durante a infecção experimental aguda. Camundongos deficientes em TNFR1 e infectados com *T. cruzi* são mais suscetíveis e apresentam alta taxa de parasitemia e sobrevida menor quando comparado aos controles. Essa susceptibilidade pode estar relacionada a maturação defeituosa de células B com consequente diminuição da Imunoglobulina G (ALIBERTI *et al.*, 2001; CASTAÑOS-VELEZ *et al.*, 1998; KROLL-PALHARES *et al.*, 2008; PÉREZ *et al.*, 2007, 2017; VILLAR *et al.*, 2013).

O TNFR2 tem menos influência no controle de parasitas durante a fase aguda, pois camundongos deficientes em TNFR2 apresentaram níveis semelhantes de parasitas circulantes quando comparado aos camundongos do grupo controle (sem deficiência) (ALIBERTI *et al.*, 2001; VILLAR *et al.*, 2013). Pérez *et al.* (2007) infectaram camundongos duplo e único *knockout* em TNFR1/2 e esses animais apresentaram alta parasitemia, mas provavelmente relacionada à deficiência do

TNFR1. Animais deficientes em TNFR2 apresentaram aumento da parasitemia, porém foram mais resistentes à morte (PÉREZ *et al.*, 2007).

Além do controle parasitário, TNFR1 parece estar envolvido no recrutamento celular e inflamação, pois camundongos deficientes neste receptor de TNF- α apresentaram ausência de infiltrado inflamatório no miocárdio quando comparado aos animais do grupo controle que apresentaram lesões graves (PÉREZ *et al.*, 2007).

Durante a infecção aguda, ambos os receptores solúveis sTNFR1/2 se elevam, mas o sTNFR2 se eleva mais rápido e em quantidades maiores se estabilizando durante a fase crônica (TRUYENS *et al.*, 1999). Ainda a relação TNF/sTNFR quando mais diminuída mais refletia piora nos camundongos comprovado por caquexia e alta parasitemia. O desequilíbrio endógeno entre receptores solúveis reflete o desfecho clínico de camundongos durante a fase aguda, onde análises em camundongos antes da morte indicaram que houve uma relação TNF/sTNFR prejudicada, quando comparada ao grupo controle (TRUYENS *et al.*, 1999).

No estudo de Bilate *et al.* (2007) foi demonstrado que a ausência da sinalização do TNF- α (pela inibição com Etanercepte) e a infecção são importantes fatores aceleradores da insuficiência cardíaca, uma vez que a função ventricular e %FEVE foram diminuídas após o tratamento com inibidor de TNF- α , o Etanercepte (proteína de fusão composta pelo sTNFR2 mais a região Fc da IgG), em *hamsters* infectados. O bloqueio do TNF- α levou a uma distribuição anormal do infiltrado inflamatório, onde as células se restringiram a região subendocárdica. Essa anormalidade pode ser explicada pela relação do TNF- α com quimiocinas, uma vez que TNF- α tem papel no aumento da expressão de quimiocinas MCP-1 e MCP-1 α e moléculas de adesão que leva a uma infiltração aumentada de leucócitos no miocárdio (BILATE *et al.*, 2007).

De acordo com Bilate *et al.* (2007) esses achados impossibilitam o uso desse bloqueador em humanos com cardiopatia chagásica crônica pelo agravamento dessa condição. Porém novos estudos utilizando esse bloqueador em outros animais, com doses diferentes ou em associação podem trazer novas perspectivas.

Em contrapartida ao uso do Etanercepte, a terapia com Infliximabe (anticorpo monoclonal IgG1 quimérico) mostrou ser promissora no tratamento de camundongos infectados cronicamente. O bloqueio do TNF- α além de não reativar a infecção,

levou a uma diminuição das células T e macrófagos no coração, além do impacto na diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento (PÉREZ *et al.*, 2009) ou manutenção (PEREIRA *et al.*, 2014) de IL-10. A terapia com Infliximabe restaurou a frequência cardíaca normal pelos dados do eletrocardiograma. Também reduziu a proporção de animais afetados por arritmias e bloqueio átrio ventricular (PEREIRA *et al.*, 2014).

Pereira *et al.* (2014) viram que houve diminuição de TNFR1 em células T após o tratamento com Infliximabe. O bloqueio interrompeu a retroalimentação positiva da sinalização TNF/TNFR1, e dessa forma levou a diminuição da ativação celular induzida pelo TNF- α . Com esses achados a curto e longo prazo, a terapia utilizando Infliximabe traz novas perspectivas no tratamento da doença de Chagas crônica, mas deve-se ter investigações mais detalhadas, como a reativação de outras infecções (PÉREZ *et al.*, 2009).

Poucos estudos abordam a expressão do TNFR em portadores da doença de Chagas crônica. Mocelin *et al.* (2005) não encontraram diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de sTNF-R1 entre os grupos, além de nenhuma associação com eventos clínicos, como sobrevida e transplante cardíaco. O pequeno número de pacientes (28) e o período limitado de análise foram lacunas para o estudo (MOCELIN *et al.*, 2005). Em outro estudo, níveis circulantes de sTNFR2 foram 60% maiores em neonatos infectados quando comparado aos não infectados e permaneceram elevados com 1 ano de idade. Podendo ser útil na orientação da presença de transmissão vertical durante a infecção (GARCÍA *et al.*, 2008).

Mecanismos apoptóticos via TNF/TNFR em linfócitos e neutrófilos desencadeados pelo *T. cruzi* podem contribuir tanto na patogênese cardíaca quanto em mecanismos de escape do parasita, respectivamente (CHAVES *et al.*, 2016; MAGALHÃES *et al.*, 2017). Linfócitos de pacientes com CCC apresentam maior frequência de células apoptóticas quando comparado com a forma IND e não infectados. Uma correlação positiva e significativa dessas células expressando TNF- α também foi vista. Os resultados mostraram que a superfamília de receptores de morte celular (FADD, TRADD, TNFRSF10A (receptor de TNF membro da superfamília 10A), TNFRSF10B, TNFRSF11B, TNFRSF21 e TNFRSF25) foram regulados positivamente quando comparados com o grupo IND, mesmo sem

estímulo *in vitro* (com antígenos solúveis de *T. cruzi*). Após estímulo, a expressão dessas moléculas aumentou consideravelmente (CHAVES *et al.*, 2016).

Neutrófilos de humanos infectados *in vitro* com a cepa *Colombiana* e *Y* revelaram ter baixa viabilidade devido à alta taxa de apoptose quando comparado aos monócitos. TNFR2 foi altamente expresso nos neutrófilos após estímulo e responsável pela apoptose juntamente com Fas ligante (FasL) (MAGALHÃES *et al.*, 2017). A morte apenas em neutrófilos foi atribuída a uma estratégia de escape do *T. cruzi* e que esse receptor tem importância durante a fase inicial da infecção. Níveis de TNFR2 foi maior em células de sangue periférico de portadores com a forma indeterminada e cardíaca quando comparada aos não infectados. Apesar de TNFR1 se elevar em PBMC dos portadores, os autores não encontraram nenhuma diferença estatística (GONZÁLEZ *et al.*, 2018).

Apesar dos avanços sobre os mecanismos de atuação e regulação dos receptores de TNF- α , ainda não está totalmente elucidado o papel dessas moléculas na imunopatogênese da doença de Chagas humana.

3 JUSTIFICATIVA

Vários são os mecanismos relacionados ao parasita e ao hospedeiro na forma crônica da doença que permanecem não elucidados, dentre eles os mecanismos imunológicos envolvidos na evolução da forma clínica indeterminada para a forma cardíaca. Já foi demonstrado em vários estudos que a citocina TNF- α desempenha um papel importante na patogênese da doença. Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que essa citocina se eleva e está diretamente relacionada ao dano cardíaco, sendo uma citocina chave na resposta imune contra o *T. cruzi* e doença de Chagas (FERREIRA *et al.*, 2013; LANNES-VIEIRA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Mas, para o TNF- α desempenhar suas funções *in vivo* é necessária a ligação a receptores presente na membrana de células, essa interação (TNF/TNFR) medeia à resistência do hospedeiro a vários agentes infecciosos levando a atividades microbidas de fagócitos além do impacto na indução de apoptose, crescimento e diferenciação celular (CASTANOS-VELEZ *et al.*, 1998). Considerados potentes inibidores da atividade da citocina e dessa forma impedem suas ações pró-inflamatórias, os receptores solúveis de TNF (sTNFR1/2) se elevam em muitas condições inflamatórias.

Entender a relação desses receptores com a gravidade da doença de Chagas, ou ainda se esses receptores têm algum papel relevante em mecanismos que auxiliam ou inibem atividades deletérias do TNF- α , contribuiria para o melhor entendimento da imunopatogênese na doença. E dessa forma ainda poderiam tornar-se biomarcadores imunológicos de gravidade e/ou prognóstico.

Sendo assim, esperamos entender a atuação de receptores solúveis no soro de portadores das formas clínicas IND e CARD (com graus distintos de insuficiência cardíaca). Estudos com essa finalidade são recomendados pelo II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2005) e pelo Programa Integrado em Doença de Chagas da Fiocruz (PIDC/Fiocruz).

4 PERGUNTA CONDUTORA

Existe diferença na concentração de TNF- α e de seus receptores solúveis (sTNFR1/2) no soro de pacientes com cardiopatia chagásica leve e grave (CARD1 e CARD2, respectivamente) quando comparados aos pacientes com a forma indeterminada (IND) e controles não-infectados (NI)?

5 OBJETIVOS

5.2 Objetivo geral

Verificar os níveis de TNF- α e de seus receptores solúveis (sTNFR1/2) no soro de pacientes com a forma clínica cardíaca leve e grave (CARD1 e CARD2) quando comparados aos portadores com a forma indeterminada (IND) e controles não-infectados (NI).

5.3 Objetivos específicos

- a) Detectar os níveis de sTNFR1, sTNFR2 e TNF- α em amostras de soro de portadores das formas clínicas crônicas IND e CARD;
- b) Correlacionar os níveis de TNF- α com seus receptores solúveis nas formas clínicas crônicas IND e CARD;
- c) Correlacionar os níveis de sTNFR1 e sTNFR2 nas formas clínicas crônicas IND e CARD;
- d) Correlacionar os níveis de TNF- α e sTNFR1 e sTNFR2 com os graus de gravidade da cardiopatia chagásica através da %FEVE.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 População e local de estudo

Foram selecionados 133 portadores crônicos da doença de Chagas. Os portadores foram atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) / Universidade de Pernambuco (UPE). O ambulatório é o local de referência no estado de Pernambuco para o acompanhamento e tratamento dos pacientes portadores da doença de Chagas.

Para sua inclusão no estudo, os pacientes preencheram sete critérios: realização dos exames clínicos (eletrocardiograma, ecocardiograma, raios-X de tórax e de esôfago) para a classificação clínica, sorologia reagente para a infecção chagásica, segundo o Ministério da Saúde (2005), não ter sido submetido ao tratamento etiológico, não apresentar queixas digestivas tais como, disfagia e constipação, não ter apresentado qualquer alteração leucocitária e não ter recebido transfusão sanguínea ou transplante de órgãos.

Assim, os indivíduos foram incluídos no estudo de acordo com os estágios de envolvimento cardíaco, onde 39 apresentavam a forma cardíaca leve (B1 ou CARD 1), 43 a forma cardíaca grave (C ou CARD 2) e 51 à forma indeterminada (A ou IND) (Tabela 1). A avaliação dos critérios de inclusão foi realizada em conjunto com médicos colaboradores deste projeto, sendo estes responsáveis pelo acompanhamento e tratamento dos portadores da doença de Chagas. Essa classificação foi feita de acordo com a I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica.

De acordo com a I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica, os indivíduos assintomáticos ou indeterminados (A) são os portadores que não possuem manifestação clínica da doença (quando há acometimento cardíaco e/ou digestivo), porém são reagentes para os testes sorológicos convencionais. O estágio B é subdividido em B1 e B2, onde em B1 o paciente apresenta alterações no ECG e percentual da %FEVE acima de 45%

apresentada no ECO o que difere do paciente B2 que apresenta %FEVE menor que 45%. O paciente pertencente ao grupo C e D já apresentam insuficiência cardíaca, com sintomas prévios ou atuais (CASTRO *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2015).

Além disso, 20 indivíduos não infectados (saudáveis) também foram selecionados para o estudo. Os indivíduos incluídos no grupo controle seguiram critérios como: não ter habitado em área endêmica para a doença de Chagas; nunca ter recebido transfusão de sangue; ter apresentado teste sorológico não reagente para a doença de Chagas e não apresentar alteração leucocitária no hemograma.

As amostras que foram utilizadas nesse estudo foram previamente coletadas em um projeto âncora e estão estocadas a -20°C na soroteca do Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC) do IAM/Fiocruz, além disso, todas as informações dos exames clínicos e de imagem bem como do tratamento utilizado para os indivíduos que apresentaram insuficiência cardíaca e comorbidades associadas e valores de %FEVE que foram adquiridos através da realização do ecocardiograma foram registradas no formulário de pesquisa específico, obtidas através dos prontuários dos pacientes e informadas pelos médicos responsáveis.

Todos os indivíduos, não infectados e infectados, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta e dessa forma participaram voluntariamente da pesquisa, no qual foi aplicado um questionário para informações como idade, sexo, se o paciente recebeu tratamento etiológico ou se fazia uso de alguma medicação para o coração. O estudo foi realizado seguindo todos os protocolos éticos de pesquisa em humanos com aprovação do comitê de ética do Instituto Aggeu Magalhães (0032.0.095.000-10).

Tabela 01. Caracterização dos pacientes.

	NI	IND	CARD 1	CARD 2
Número de pacientes	20	51	39	43
Idade (anos) *	24.6 ± 6.2	53.2 ± 11.2	62.0 ± 9.3	58.9 ± 10.4
Sexo				
Masculino	10	19	13	19
Feminino	10	32	26	24
Ecocardiograma FEVE(%)*	-	66.9 ± 5.0	63.2 ± 7.4	39 ± 12.9

NI: não infectado; IND: forma indeterminada; CARD 1: forma cardíaca leve; CARD 2: forma cardíaca grave. *média ± desvio padrão. FEVE: Fração de Ejeção Ventricular Esquerda.

6.2 Confirmação da sorologia para a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizados dois testes imunoenzimáticos para a confirmação da infecção chagásica com registro ativo na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo um deles o Elisa convencional, *kit* comercial Test Elisa Chagas III (Biochile®, Grupo Bio, Santiago, Chile). A microplaca é sensibilizada com lisado total das cepas de *T. cruzi Tulahuén e Mn*, incluindo antígenos de membrana altamente imunogênicos. E o outro, denominado Elisa recombinante, *kit* comercial Imuno-Elisa Wama (Wama Diagnóstica®, São Carlos, Brasil), que utiliza antígenos recombinantes purificados.

A metodologia foi realizada conforme orientações dos fabricantes. Os resultados foram interpretados como reagentes quando ambos os testes apresentarem reatividade e não-reagentes quando ambos não apresentarem reatividade (Ministério da Saúde, 2005). Amostras que se mantiveram discordantes mesmo após repetição dos testes foram interpretadas como inconclusivas, sendo excluídas da pesquisa. Estes ensaios foram realizados no Serviço de Referência em Doença de Chagas do Instituto Aggeu Magalhães (SRDC/IAM-PE).

6.3 Quantificação de receptores solúveis de TNF- α (sTNFR1 e sTNFR2) e TNF- α em amostras de soro por *Cytometric Bead Array* (CBA)

Os níveis de receptores solúveis de TNF- α (sTNFR1 e sTNFR2) e TNF- α foram quantificados através do sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) Flex, seguindo as instruções do fabricante, com adaptação (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA). Para gerar a curva padrão das *beads* analisadas, inicialmente os padrões de citocinas foram submetidas a diluição seriada com diluente do Kit (Top Standard – 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 –20 pg/mL).

Primeiramente, 25 μ L da mistura de *beads* de captura, conjugados com anticorpos monoclonais (anti-sTNFR1, anti-sTNFR2 e anti-TNF- α) foram transferidas para tubos de poliestireno (5mL) (BD Systems™) devidamente identificados.

Em seguida, 25 μ L das amostras (soro)/padrão foram adicionados por 3h à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Depois foi adicionado 25 μ L do reagente de detecção contendo anticorpos anti-citocinas alvos conjugados à *Phycoerythrin* (PE) por 2h à temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz. Após a incubação, as *beads* foram lavadas e 300 μ L de solução tampão adicionados para ressuspender às esferas.

As *beads* foram adquiridas dentro de 24h utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) / Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Inicialmente foi aberto o *template* “CBA Acquisition Flex” para a construção dos *dot plots* para definição dos parâmetros de análise. Os histogramas representando características de tamanho e granulidade das *beads* analisadas (FSC x SSC) e histogramas de intensidade de fluorescência emitidos pelo anticorpo de detecção lido em FL3 e FL4 foram construídos.

Dessa forma, para cada tubo processado foram contados 900 eventos dentro da região selecionada R1. As *beads* com seus diferentes anticorpos de captura apresentam tamanhos diferentes e por isso se apresentam no gráfico em locais distintos. Quando ligada aos analitos, formando o complexo “esfera-citocina-anticorpo PE” emitem fluorescências diferentes, e dessa forma se deslocam de acordo com a intensidade de fluorescência emitida. As análises foram realizadas através do *Software FCAP Array* versão 3.01 (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA).

6.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software PRISM 5.0 Windows® (E.U.A.). A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de medidas descritivas como: média, mediana e desvio padrão. Inicialmente foi aplicado um teste de normalidade (D’Agostino) onde foi verificado que os dados eram não paramétricos, posteriormente foi utilizado o Kruskal-Wallis para avaliar a associação entre os grupos. Verificada a associação, o teste Mann-Whitney foi utilizado para as comparações quantitativas dos receptores e citocina entre grupos. A avaliação das correlações entre TNFR1/2 *versus* TNF- α , TNFR1 *versus* TNFR2 e TNFR1/2, TNF *versus* %FEVE foi realizada através do teste de correlação não-paramétrica de Spearman. O coeficiente de correlação de Spearman (r) varia de -1 a +1; valores +1

indicam uma correlação positiva perfeita; 0 a 1 indicam que as duas variáveis tendem a aumentar ou diminuir juntas; 0 indica que as duas variáveis não variam em conjunto; 0 a -1 uma variável aumenta a medida que a outra diminui; -1 indica uma correlação negativa perfeita. Então essas correlações são classificadas como fraca, quando r : 0,00 a 0,29; baixa, quando r : 0,30 a 0,49; moderada, quando r : 0,50 a 0,69; forte, quando r : 0,70 a 0,89 e muito forte quando r : 0,90 a 1,00. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

7 RESULTADOS

7.1 Artigo que será submetido à Revista *Scandinavian Journal of Immunology*:

Níveis de receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) estão elevados no soro de pacientes com doença de Chagas crônica.

Resumo

Receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) são considerados inibidores naturais endógenos do TNF e encontram-se elevados em muitas doenças inflamatórias, autoimunes e crônicas. Os mecanismos imunológicos envolvidos na evolução das formas clínicas em portadores crônicos da doença de Chagas permanecem não elucidados. O fator de necrose tumoral (TNF), citocina mais pleiotrópica do sistema imune, é considerada uma das chaves na imunopatologia da doença de Chagas. Nosso objetivo foi avaliar o TNF e sTNFR1 e sTNFR2 no soro de portadores crônicos da doença de Chagas. Foram incluídos 133 pacientes, sendo 51 com a forma indeterminada (IND), 39 com a forma cardíaca leve (CARD 1) e 43 com a forma cardíaca grave (CARD 2), além de 20 indivíduos não infectados (NI). Os resultados apontam que os receptores solúveis atuam na regulação do TNF na doença de Chagas, pois tem seus níveis sorológicos elevados nesses portadores quando comparado aos indivíduos não infectados, apesar de não haver diferença estatística entre os portadores, o sTNFR1 aumentou de acordo com a gravidade da doença. Além disso, verificamos uma correlação negativa entre sTNFR1 e TNF em indivíduos portadores da forma IND, sugerindo que essa relação pode impedir a progressão para formas mais graves, como a forma cardíaca. sTNFR1 e sTNFR2 se elevam em todas as formas clínicas, porém com uma moderada correlação positiva nos pacientes mais graves ($r:0.50$ e $p:0.0005$). Os achados sugerem a importância no balanço endógeno dos receptores solúveis de TNF, e podem indicar proteção e equilíbrio nos pacientes com doença de Chagas crônica. Além disso a via TNF/TNFR1 parece ter grande contribuição no curso crônico da doença.

1 | INTRODUÇÃO

É estimado que a doença de Chagas, causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, afeta mais de 8 milhões de pessoas ao redor do mundo^{1,2} e que aproximadamente 70 milhões de pessoas estão sob risco de infecção.^{3,4} Tem distribuição em mais de 21 países da América Latina causando mais de 10.000 mortes anuais sendo um grave problema de saúde pública no Brasil devido aos atuais surtos de infecção pela via oral, necessitando de medidas sanitárias urgentes.^{3,5}

A forma indeterminada é responsável pela maioria dos casos, 70%, onde o portador tem as mesmas expectativas de vida de uma pessoa sem a doença, esses indivíduos apresentam testes sorológicos reagentes, mas possuem exames de imagem normais e ausência de sintomas clínicos.^{5,6,7}

A forma cardíaca ou cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a manifestação crônica mais grave e maior responsável pela mortalidade na doença, acometendo cerca de 30% dos indivíduos.⁸ O intenso infiltrado inflamatório frente ao parasita contribui para sua diminuição tanto a nível sistêmico quanto a nível tecidual.⁹ Porém, devido à persistência do parasita (em órgãos como o coração) na fase crônica, uma resposta imune celular é montada levando a exaustivo dano tecidual sem reparos.⁹

Não se sabe ao certo quais são os mecanismos envolvidos na evolução clínica do portador da forma indeterminada para a forma sintomática, mas acredita-se que a resposta imune frente ao protozoário tenha importante contribuição. As citocinas produzidas pelos linfócitos ativados regulam a resposta imune e são implicadas tanto na resistência à infecção quanto na evolução clínica dos portadores da doença de Chagas.¹⁰ As análises dos perfis de citocinas pró e anti-inflamatório sugerem que a IL-10 está mais elevada em indivíduos com a forma indeterminada quando comparada aos da forma cardíaca.

Em contrapartida, citocinas pró-inflamatórias, como o interferon gama (IFN- γ)^{11,12}, fator de necrose tumoral (TNF)¹³⁻¹⁴ e IL-17¹⁵ estão em níveis mais elevados

em portadores da forma cardíaca e possivelmente, representam piora da função cardíaca. Além disso, níveis elevados de TNF estavam presentes em indivíduos portadores da cardiopatia chagásica que foram a óbito por acidente vascular cerebral (AVC), sugerindo que níveis elevados dessa citocina aumenta o risco de desenvolvimento de AVC estando relacionada com piora cardíaca.^{13-15,17}

O TNF foi descrito em 1973 como uma endotoxina que causava necrose em tumores *in vitro*.¹⁸ É altamente inflamatório e considerado a citocina mais pleiotrópica, ou seja, desempenha funções em diversos tipos celulares. Seu papel é associado a várias patologias infecto parasitárias, autoimunes, neoplásicas e inflamatórias.¹⁹ O TNF é resultado de uma clivagem da enzima conversora de TNF (TACE) sendo expressa inicialmente como uma proteína transmembrana em diversas células imunológicas como, monócitos/macrófagos, células NK e linfócitos T, além de células endoteliais e fibroblastos.^{20,21}

Para desempenhar suas várias funções, eventos imunomoleculares complexos acontecem após a ligação aos seus receptores. Com a ação da TACE, o TNF transmembrana (mTNF) é convertido a TNF solúvel (sTNF), sendo esta a forma circulante, com capacidade endócrina de agir em locais distantes.^{19,22,23} O sTNF e o TNF se ligam aos seus respectivos receptores transmembranares, os receptores de fator de necrose tumoral do tipo 1 (TNFR1 ou CD120a) e do tipo 2 (TNFR2 ou CD120b), onde o mTNF tem mais afinidade pelo TNFR2 e o sTNF tem mais afinidade pelo TNFR1. Ambos os receptores são encontrados constitutivamente nas células, porém o TNFR2 tem expressão muito mais restrita.²⁴ Esses receptores também são clivados e se tornam receptores solúveis do tipo 1 e 2 (sTNFR 1/2), sendo considerados potentes inibidores naturais de TNF, uma vez que são capazes de competir pelo sítio de ligação do TNF, impedindo sua ativação.

Foi demonstrado *in vivo* que a via TNF/TNFR1 desempenha importante papel na infecção pelo *T.cruzi*, uma vez que camundongos *knockout* de TNFR1 não sobrevivem à infecção devido à alta parasitemia, desequilíbrio imunológico e caquexia.²⁵⁻²⁹ Além disso os receptores solúveis limitam a atividade deletéria do TNF.³⁰ Em humanos, o TNF vem sendo considerado uma citocina chave nos mecanismos imunopatológicos durante a fase crônica dos portadores da doença de Chagas. Portanto, avaliar receptores solúveis, que são considerados inibidores da citocina, além de auxiliar o entendimento dessa imuno-modulação, pode ajudar na

busca por biomarcadores imunológicos para o diagnóstico, progressão e gravidade da doença.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 | População e local do estudo

Foram selecionados 133 portadores crônicos da doença de Chagas que foram atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) / Universidade de Pernambuco (UPE). Após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram coletados 10mL de sangue para os ensaios e confirmação do diagnóstico da infecção.

As amostras foram alíquotadas e armazenadas a -20°C na soroteca do Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM). A confirmação da infecção foi realizada através da utilização de dois testes imunoenzimáticos sendo um deles o Elisa convencional, kit comercial Test Elisa Chagas III (Biochile, Grupo Bio, Santiago, Chile) e Elisa recombinante, kit comercial Imuno-Elisa Wama (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brasil) conforme orientações dos fabricantes e de acordo com II Consenso Brasileiro em doença de Chagas.

Indivíduos que receberam tratamento prévio com Benzonidazol e/ou que apresentaram queixas digestivas foram excluídos do estudo. As seleções e classificação foram realizadas por médicos cardiologistas do PROCAPE, seguindo a I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica.³¹ Os indivíduos foram incluídos no estudo após confirmação dos testes sorológicos e positividade nos exames de imagem como Ecocardiograma (ECO), Eletrocardiograma (ECG), Raio X de Tórax e Esôfago. Assim, os pacientes foram classificados em A ou forma indeterminada (IND) (n=51), sem sintomas cardíacos e com ECG e ECO normais; B1 ou forma cardíaca leve (CARD 1) (n=39), com doença cardíaca estrutural, evidenciada por ECG ou ECO, mas com função ventricular global normal e sem sinais e sintomas atuais e anteriores de insuficiência cardíaca congestiva (ICC); C ou forma cardíaca grave (CARD 2) (n=43) com disfunção

ventricular e sintomas atuais ou anteriores de ICC (Tabela 1). Além disso, foram incluídos no estudo 20 indivíduos não infectados (NI) como controles que não poderiam ter habitado em área endêmica para a doença de Chagas; nunca ter recebido transfusão de sangue; ter apresentado teste sorológico não reagente para a doença de Chagas e não apresentar alteração leucocitária no hemograma.

Tabela 01. Caracterização dos pacientes

	NI	IND	CARD 1	CARD 2
Número de pacientes	20	51	39	43
Idade (anos) *	24.6 ± 6.2	53.2 ± 11.2	62.0 ± 9.3	58.9 ± 10.4
Sexo				
Masculino	10	19	13	19
Feminino	10	32	26	24
Ecocardiograma FEVE (%)*	-	66.9 ± 5.0	63.2 ± 7.4	39 ± 12.9

NI: não infectado; IND: forma indeterminada; CARD 1: forma cardíaca leve; CARD 2: forma cardíaca grave. *média ± desvio padrão. FEVE: Fração de ejeção ventricular esquerda.

2.2 | Quantificação de receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) e TNF- α em amostras de soro por *Cytometric Bead Array* (CBA).

Os níveis de receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) e TNF- α foram quantificados nas amostras de soro dos indivíduos através do sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) *Human Flex*, seguindo as instruções do fabricante (Beckton Dickson). As *beads* foram adquiridas dentro de 24h utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson) e analisadas através do *Software FCAP Array* versão 3.01 (Beckton Dickson). Os limites de detecção para TNF, sTNFR1 e sTNFR2 foram de 3,08, 1,81 e 2,27 pg/mL, respectivamente.

2.3 | Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do software PRISM 5.0 Windows® (E.U.A.). A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de medidas descritivas como: média, mediana e desvio padrão. Inicialmente foi aplicado um teste de normalidade (D'Agostino) onde foi verificado que os dados eram não paramétricos, posteriormente foi utilizado o Kruskal-Wallis para avaliar a associação

entre os grupos. Verificada a associação, o teste Mann-Whitney foi utilizado para as comparações quantitativas dos receptores e citocina entre grupos. A avaliação das correlações entre TNFR1/2 *versus* TNF- α , TNFR1 *versus* TNFR2 e TNFR1/2, TNF *versus* %FEVE foi realizada através do teste de correlação não-paramétrica de Spearman. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

3 | RESULTADOS

3.1 | Os receptores solúveis do TNF aumentam no soro de pacientes com doença de Chagas

Verificamos que o sTNFR1 e sTNFR2 estão elevados em portadores crônicos de doença de Chagas (IND, CARD 1 e CARD 2) quando comparados aos indivíduos não infectados (NI) (Fig. 1A e 1B). Mas, nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos estudados foi observada. Por outro lado, observamos que o sTNFR1 se eleva gradualmente à medida que ocorre o agravamento da doença (Mediana: IND: 153.3 pg/mL; CARD 1: 167.8 pg/mL; CARD 2: 199.3 pg/mL).

Níveis séricos de TNF permaneceram abaixo do limite de detecção para o TNF (< 3,08 pg/mL). Porém, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados, os portadores da forma IND apresentaram níveis de TNF mais baixos (Mediana: 0,39 pg/mL) quando comparados aos indivíduos não infectados e portadores da forma cardíaca (Mediana: 0,48 e 0,45 pg/mL, respectivamente) (Fig. 1C).

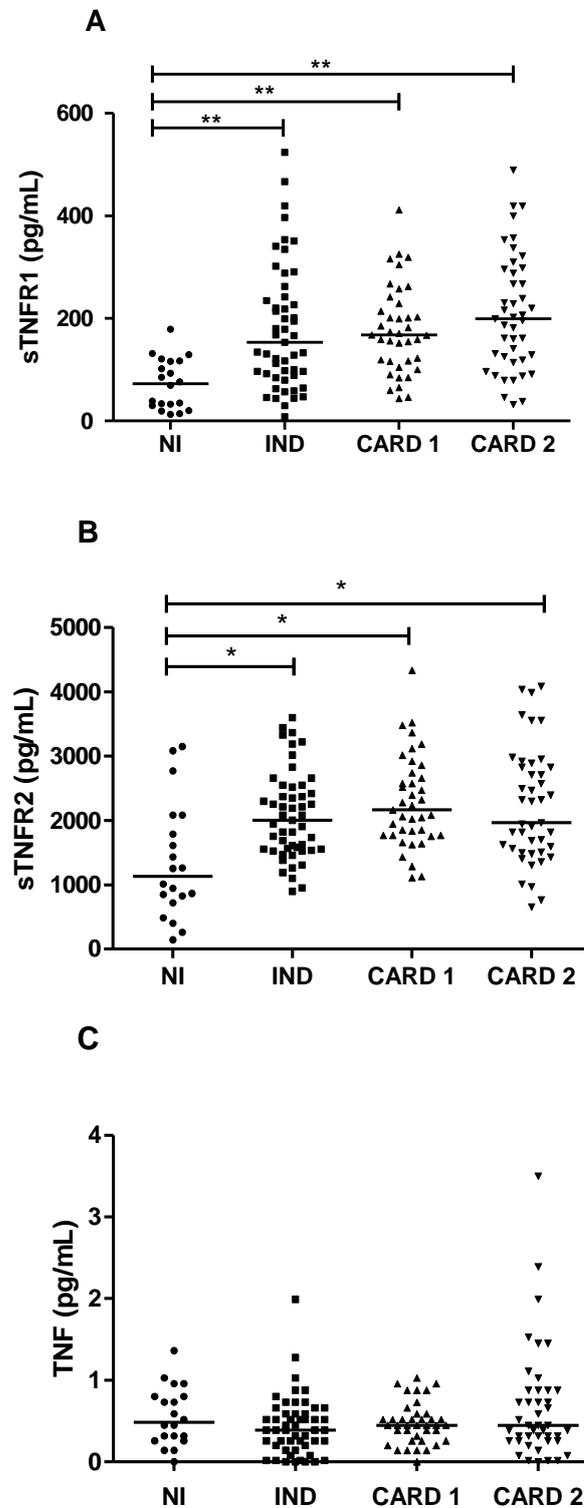


Figura 1. Concentração de TNF e de seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) em soro de pacientes infectados e não infectados. Legenda: Grupos NI (n=20), IND (n=51), CARD 1 (n=39) e CARD 2 (n=43). As linhas representam a mediana de cada grupo e as diferenças estatísticas são indicadas pelas barras sendo representadas por * $P < 0,05$ e ** $P \leq 0,0001$.

3.2 | sTNFR1 correlaciona-se negativamente com TNF no soro de pacientes com a forma indeterminada, mas sTNFR1 e sTNFR2 aumentam em todas as formas clínicas

Correlacionamos os níveis de TNF com seus receptores nas formas clínicas IND e CARD (Tabela 2). Encontramos uma correlação negativa baixa, mas existente ($r: -0,38$ $p: 0,0058$) entre sTNFR1 e TNF, o que nos sugere que a medida que o sTNFR1 aumenta, os níveis de TNF diminuem em portadores IND da doença de Chagas. Não houve nenhuma correlação significativa entre o sTNFR2/TNF em portadores crônicos e nem entre sTNFR1/TNF nos portadores CARD 1 e CARD 2. Ao correlacionar o sTNFR1 *versus* sTNFR2, verificamos uma correlação positiva, mas o CARD 2 apresentou um R maior quando comparado ao IND e CARD 1, sendo portanto uma correlação moderada (Fig 2 A, B e C).

Tabela 2- Correlação entre a concentração sorológica de sTNFR1/2 e TNF em portadores crônicos da doença de Chagas

	IND		CARD 1		CARD 2		TODAS	
	r	p	r	p	r	p	r	p
sTNFR1 vs TNF	-0,38	0,0058	-0,16	0,3256	-0,06	0,6756	-0,20	0,0208
sTNFR2 vs TNF	-0,24	0,0820	0,22	0,5251	-0,23	0,1362	-0,12	0,1537

Legenda: r: rank de Spearman; p: *p value*

Para avaliar a relação dos receptores e TNF com o grau da disfunção cardíaca, fizemos uma correlação com dados do percentual de fração de ejeção ventricular esquerda (%FEVE), não sendo encontrado nenhuma correlação significativa.

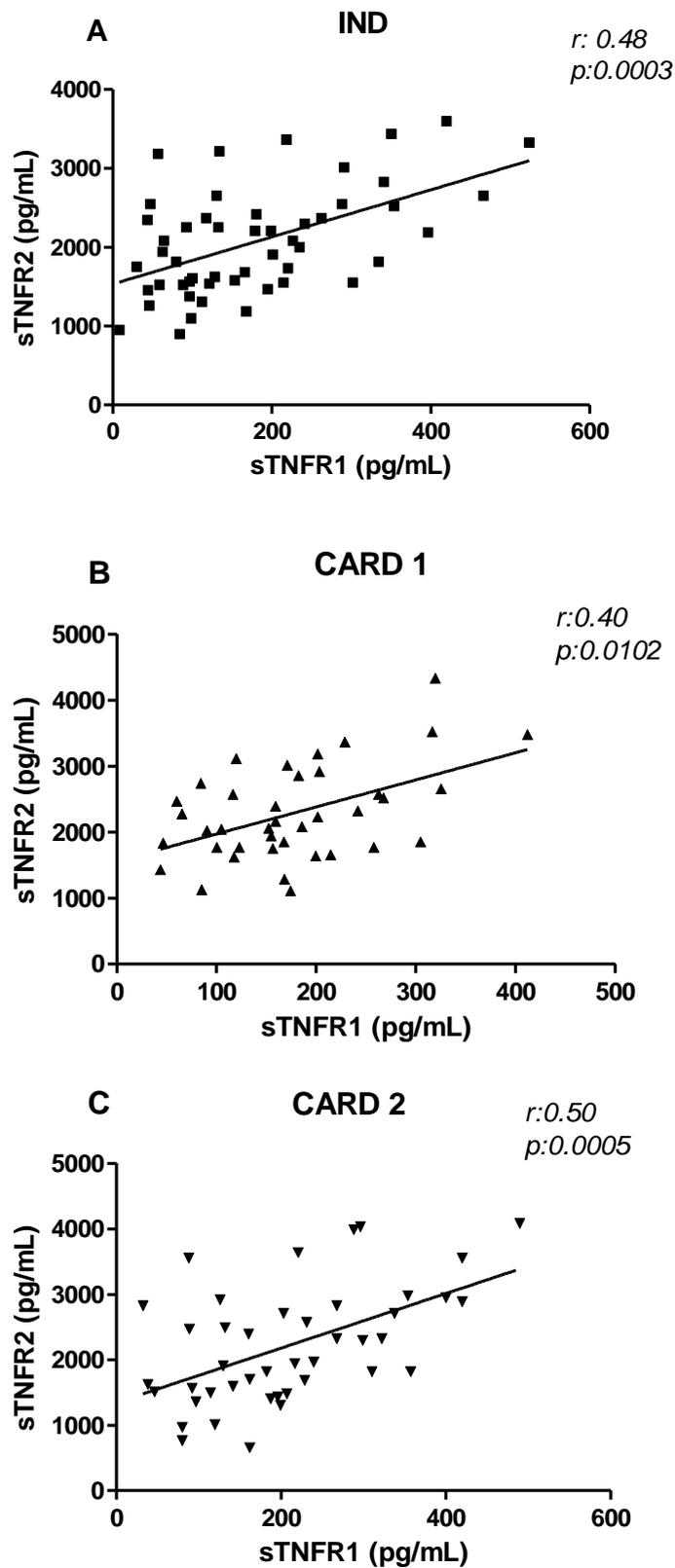


Figura 2. Correlações entre as concentrações sorológicas de sTNFR1 e sTNFR2 em portadores crônicos da doença de Chagas. Legenda: A linha representa a regressão linear para cada comparação; CARD 1: forma cardíaca leve; CARD 2: forma cardíaca grave.

4 | Discussão

A via TNF/TNFR1 desempenha papel importante na infecção pelo *T. cruzi*, pois além de ter importância no controle da parasitemia, tem impacto na indução da inflamação, caquexia e sobrevida de animais infectados.²⁵⁻²⁹ Os receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) tem como objetivo a neutralização da citocina, sendo considerados potentes inibidores naturais endógenos do TNF.³² Nosso objetivo foi dosar esses receptores em soro de portadores crônicos da doença de Chagas, visando entender seu papel nos mecanismos que auxiliam ou inibem atividades deletérias do TNF e se eles poderiam tornar-se biomarcadores imunológicos de gravidade e/ou prognóstico.

Os resultados mostraram que os receptores solúveis de TNF estão em níveis maiores no soro de portadores da doença de Chagas crônica quando comparado aos indivíduos não infectados. Esse aumento é esperado uma vez que a doença de Chagas é uma patologia inflamatória crônica corroborando com estudos em algumas doenças autoimunes, inflamatórias e crônicas^{33,34,35} além de infecto parasitárias³⁶ e oncohematológicas.³⁷ Níveis plasmáticos de sTNFR1/2 se elevam em pacientes com leishmaniose visceral, com uma correlação positiva e forte entre esses receptores nos indivíduos acometidos.³⁸ Níveis de sTNFR1 em sobrenadante de cultura de células de indivíduos com leishmaniose cutânea ativa foi maior quando comparado aos controles e significativamente diminuída após o tratamento.³⁹

Verificamos uma correlação moderada desses receptores nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Porém a correlação de sTNFR2 vs sTNFR1 foi mais forte na forma cardíaca mais grave quando comparada a cardíaca leve. Acreditamos que esse aumento possa ter efeitos regulatórios da atividade do TNF e dessa forma impedir ou atenuar suas ações deletérias no tecido cardíaco de indivíduos infectados cronicamente.

Nossos achados corroboram com alguns estudos *in vivo* e *ex vivo* onde os níveis de sTNFR2 é muito maior no plasma e soro de animais e humanos infectados.^{30,40} González *et al.* (2018) verificaram que os níveis de TNFR2 foi maior em células de sangue periférico de portadores com a forma indeterminada e cardíaca quando comparada aos não infectados. Por outro lado, os autores não encontraram diferença estatisticamente significativas nos níveis plasmáticos de TNF, nem de

TNFR1 entre os portadores crônicos das diferentes formas clínicas ou quando estes foram comparados aos indivíduos do grupo controle.⁴²

Mocelin *et al.* (2005) não encontraram nenhuma diferença estatística significativa ao avaliarem os níveis plasmáticos de sTNFR1 entre portadores crônicos da doença de Chagas e indivíduos sem infecção. O pequeno número de pacientes (28) e a técnica utilizada pelos autores podem ter sido vieses para o estudo. Para avaliar os receptores solúveis e TNF utilizamos o CBA, que é mais sensível que o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).⁴³

A via TNF/TNFR1 parece ser a mais importante na infecção pelo *T. cruzi*, tanto na fase aguda como na fase crônica. Tendo impacto no controle parasitário, sobrevida e inflamação de animais infectados.²⁵⁻²⁹ A resposta imunológica celular e humoral em camundongos TNFR1^{-/-} é desregulada durante a infecção, sendo assim, células provenientes de animais deficientes em TNFR1 não apresentam boa capacidade tripanocida, além da baixa produção de IgG.²⁵

O TNFR1 é importante no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, mas não de linfócitos para o sítio de inóculo, uma vez que camundongos deficientes em TNFR1 não apresentaram essas células da resposta imune inata nos locais de inóculo.²⁶ Em contrapartida, tecidos cardíacos de camundongos TNFR1^{-/-} apresentaram uma diminuição de linfócitos TCD4 e TCD8, demonstrando o papel do receptor na indução da miocardite, sobretudo composta por linfócitos durante a infecção aguda.^{26,28} Apesar de não estudarmos a expressão dos receptores transmembranares (mTNFR) e de não ter tido diferença estatisticamente significativa entre as formas clínicas da doença de Chagas, o sTNFR1 se eleva de acordo com a gravidade da doença.

Embora o TNF desempenhe um papel benéfico durante a fase aguda em animais infectados, também desencadeia efeitos prejudiciais como caquexia e morte. Esses efeitos são limitados pela ação endógena de seus receptores solúveis e determina o desfecho da infecção.³⁰ O sTNFR2 foi mais associado a uma atividade neutralizante da citocina TNF em plasma de camundongos. Razões baixas de sTNFR/TNF foram associadas a mortalidade e caquexia em animais infectados não tratados e tratados com anticorpo TN3 anti-TNF.³⁰

Fizemos uma correlação entre sTNFR1 e TNF nos indivíduos com as formas clínicas crônicas da doença e verificamos uma correlação moderada e negativa, onde o aumento dos níveis de sTNFR1 foi associado a uma diminuição do TNF,

esses achados podem sustentar a ideia de que o receptor sTNFR1 esteja regulando a atividade do TNF nos indivíduos com a forma indeterminada podendo amenizar seus efeitos deletérios nos órgãos como coração ou até mesmo impedir a evolução para formas mais graves da doença uma vez que a forma indeterminada representa um equilíbrio entre hospedeiro e parasita e as formas cardíaca um desequilíbrio.⁴⁴

Alguns estudos em humanos, utilizando plasma ou sobrenadante de cultura mostraram que os níveis de TNF se elevam em pacientes com cardiopatia chagásica crônica quando comparado aos pacientes com a forma indeterminada, e que esse aumento está diretamente relacionado com o dano cardíaco.^{13,14,15} Não encontramos diferenças significativas nos níveis de TNF. Para afastar a hipótese de que houve degradação da citocina durante o tempo de experimento, plotamos apenas amostras que foram descongeladas nenhuma ou apenas uma vez. Afastamos também a possibilidade de algum defeito sobre o kit CBA Flex TNF, pois a curva foi linear com coeficiente de correlação (R^2) de 98,96%. Porém, acreditamos também no consumo do TNF nos sítios inflamados do organismo, principalmente nos portadores com cardiopatia chagásica, onde a mediana foi menor quando comparada aos indivíduos não infectados.

Quantidades menores de TNF em indivíduos IND também pode ser explicada pela maior neutralização do sTNFR1 sobre o TNF, já que encontramos uma correlação negativa entre sTNFR1xTNF no grupo de indivíduos IND. Acreditamos ainda nos efeitos da diluição no sangue e que uma liberação focada de TNF em alguns órgãos pode não refletir a níveis circulatórios.^{15,40}

Ward *et al.* (1999) mensuraram os níveis séricos da IL-2, IFN- γ e do TNF em 91 portadores da doença de Chagas em suas diferentes formas clínicas. Não houve diferença dos níveis das citocinas entre portadores e entre os controles. Os níveis séricos de TNF foram indetectáveis e IFN- γ não diferiu nas diferentes formas clínicas ou com a severidade da doença. Os resultados além de corroborarem com esses achados, mostram que nos portadores da forma IND, os níveis de TNF foram os menores encontrados. Portadores da forma IND apresentam um perfil mais anti-inflamatório com persistência do parasita^{12,45,46} podendo também está relacionado à falta de ativação de um perfil Th1 e que isso possa ter algum envolvimento cardíaco já que a imunidade protetora está relacionada com um aumento da resposta do tipo Th1.^{47,48}

Pisseti *et al.* (2009) viram que as dosagens plasmáticas de IFN- γ , IL-10 e de TNF não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre controles e indivíduos soropositivos. Em contrapartida, IL-10 aumentou em portadores crônicos quando comparado aos saudáveis, e que este aumento chama a atenção para as propriedades imunomodulatórias com regulação do processo inflamatório e escape do parasita.⁴⁹ IL-10 atua inibindo a atividade pró-inflamatória do TNF de maneira indireta pelo aumento de receptores solúveis e diminuição de receptores transmembranas ou de maneira direta pela inibição da liberação do TNF.⁵⁰ Análises em sobrenadante de cultura revelaram que apenas o estímulo com mitógeno foi essencial para a produção de TNF em indivíduos infectados. Mesmo após estímulo dependente (com antígenos de Epimastigota (Epi) não houve diferença estatística.^{51,52}

Esses achados sugerem a importância do balanço endógeno dos receptores solúveis de TNF, podendo indicar uma proteção nos pacientes com doença de Chagas crônica. Além disso, a via TNF/TNFR1 parece ser primordial no curso crônico da doença em humanos. Estudos mais detalhados, como a avaliação desses receptores em células de sangue periférico provenientes de portadores crônicos, estudo de perfis de citocinas, frequência de receptores envolvidos na apoptose e análises dessas células após bloqueio com drogas inibidoras de TNF merecem destaque e contribuiriam para o entendimento da imunopatologia da doença de Chagas crônica.

Declaração de ética

Todos os indivíduos, não infectados e infectados, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta e dessa forma participaram voluntariamente da pesquisa, no qual foi aplicado um questionário para informações como idade, sexo, se o paciente recebeu tratamento etiológico ou se fazia uso de alguma medicação para o coração. O estudo foi realizado seguindo todos os protocolos éticos de pesquisa em humanos com aprovação do comitê de ética do Instituto Aggeu Magalhães (0032.0.095.000-10).

Contribuições dos autores

Todos os autores contribuíram diretamente para o trabalho. GOMES YM cedeu as amostras para realização dos experimentos. DE ARRUDA TR realizou as dosagens pelo CBA. GONÇALES JP e BARROS MS contribuíram com análises e interpretações dos dados. TORRES DJL e LORENA VMB contribuíram em todos os quesitos desde os experimentos até a redação deste artigo.

Agradecimentos

Os autores são gratos à todos os pacientes que se voluntariaram no estudo e ao Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE). Ao Instituto Aggeu Magalhães por todo suporte técnico-científico, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) (Universal/CNPq 474926/2012-5), e ao Programa de Excelência em Pesquisa da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (Proep-Facepe APQ-1703-2.11/15) pelo suporte financeiro.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesses

Referências

1. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*, 2010;115: 14–21.
2. World Health Organization. Chagas Disease. 2019. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 28 out. 2018.
3. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases 2013.
4. Bilbe, G. Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. *Science*, 2015; 348: 974-976.

5. World health organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 2015; 33–44
6. Carlos pinto dias, J. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 2016; 25: 1–10.
7. Ribeiro, A L.; Rocha, M. O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 1998; 31: 301–314.
8. Rassi Jr. A, Rassi A, Little WC. Chagas heart disease. *Clin Cardiol*, 2000; 23: 883-889.
9. Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol* 2009; 31: 673-685.
10. Brodskyn, C. I.; Barral-neto, M. Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000: 170-176.
11. Keating SM, Deng X, Fernandes F, Cunha-Neto E *et al.* Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. *Int J Cardiol*, 2015; 199: 451-459.
12. Souza GR, Gomes JAS, Fares RCG *et al.* Plasma Cytokine Expression Is Associated with Cardiac Morbidity in Chagas Disease. *Plos One*, 2014; 9: 1-9.
13. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LCJ *et al.* Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/ "Indeterminate" and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2003; 98: 407-412.
14. Talvani A, Rocha MOC, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor— α in Chagasic Cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 943-950.
15. Rodrigues DBR, Dos reis MA, Romano A, *et al.* In Situ Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells in Chagas' Disease Patients with Heart Failure. *Clin Dev Immunol*, 2012; 2012: 1-7.
16. Almeida MS, Lorena VMB, Medeiros CA, *et al.* Alternative Th17 and CD4+ CD25+ FoxP3+ cell frequencies increase and correlate with worse cardiac function in Chagas cardiomyopathy. *Scand J Immunol*, 2018; 87: 1-11.
17. Guedes PMM, De andrade CM, Nunes DF *et al.* Inflammation Enhances the Risks of Stroke and Death in Chronic Chagas Disease Patients. *Plos Negl Trop Dis*, 2016; 10: 1-18.
18. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-

- induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci*, 1975; 72: 3666–3670.
19. Sedger LM, Mcdermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014; 25: 453–472.
 20. Tsai EY, Yie J, Thanos D, Goldfeld AE. Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol Cell Biol*, 1996; 16: 5232-5244.
 21. Issuree PD, Marezky T, Mcilwain DR *et al.* IRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2013; 25: 1-5.
 22. Black RA, Durie FH, Otten-Evans C *et al.* Relaxed Specificity of Matrix Metalloproteinases (MMPS) and TIMP Insensitivity of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Production Suggest the Major TNF- α Converting Enzyme Is Not an MMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996; 225: 400-405.
 23. Moss, ML, Jin SL, Milla ME *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, 1997 ; 385 : 733-736.
 24. Carpentier I, Coornaert B, Beyaert R. Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2. *Curr med chem*, 2004; 11: 2205–2212.
 25. Castaños-Velez E, Maerlan S, Osorio LM *et al.* *Trypanosoma cruzi* Infection in Tumor Necrosis Factor Receptor p55-Deficient Mice. *Infect Immun*, 1998; 66: 2960-2968.
 26. Aliberti JCS, Souto JT, Marino APMP *et al.* Modulation of Chemokine Production and Inflammatory Responses in Interferon- γ - and Tumor Necrosis Factor-R1-Deficient Mice during *Trypanosoma cruzi* Infection. *Am J Pathol* 2001; 158: 1433-1440.
 27. Pérez AR, Roggero E, Nicora A, *et al.* Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain Behav and Immun* 2007; 21: 890-900.
 28. Kroll-palhares K, Silvério JC, Da silva AA *et al.* TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF- α blockade. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2008; 103: 375-385
 29. Villar SR, Ronco MT, Bussy RF *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Regulates Glucocorticoid Synthesis in the Adrenal Glands of *Trypanosoma cruzi* Acutely-Infected Mice. The Role of TNF-R1. *Plos One*, 2013; 8: 1-13.
 30. Truyens C, Torrico F, Lucas R, De Baetselier P, Buurman WA, Carlier Y. The Endogenous Balance of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors and Tumor

Necrosis Factor Modulates Cachexia and Mortality in Mice Acutely Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 1999; 67: 5579-5586.

31. Andrade JP, Marin-neto JA, Paola AAV, *et al*. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. *Arq Bras Cardiol*, 2011; 97: 1-48.
32. Van Zee, KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 4845-4849.
33. Safranow K, Dziedziejko V, Rzeuski R *et al*. Plasma concentrations of TNF- α and its soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 in patients with coronary artery disease. *Tissue Antigens*, 2009; 74: 386-392.
34. Kim HL, Lee JP, An JN *et al*. Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors and Arterial Stiffness in Patients With Coronary Atherosclerosis. *Am J Hypertens*, 2016; 1-6.
35. Arias J, Valero N, Mosquera J, *et al*. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology* 2014; 452-453: 42-51.
36. Bessa TF, Cordeiro CA, Gonçalves RM, *et al* . Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor-2 (sTNFR2) in patients with active toxoplasmic retinochoroiditis. *Braz J Infect Dis*, 2012; 16: 540-544.
37. Vinante F, Rigo A, Tecchio C, *et al*. Serum levels of p55 and p75 soluble TNF receptors in adult acute leukaemia at diagnosis: correlation with clinical and biological features and outcome. *Br J Haematol* 1998; 102: 1025-1034.
38. Medeiros IM, Reed S, Castelo A, Salomão R. Circulating levels of sTNFR and discrepancy between cytotoxicity and immunoreactivity of TNF-a in patients with visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 34-37.
39. Rostami MN, Jasbi ES, Khamesipour A, Mohammadi AM. Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and its soluble receptor type 1 (sTNFR I) in human active and healed leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2016; 38: 255-260.
40. García MM, De rissio AM, Villalonga X, Mengoni E, Cardon LR. Soluble Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors (sTNF-R1 and -R2) in Pregnant Women Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi* and their Children. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2008; 78: 499-503.
41. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, *et al*. Plasma Cytokine Parameters and Mortality in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation* 2000; 102: 3060-3067.

42. González F, Villar S, D'Attilio, *et al.* Dysregulated Network of Immune, Endocrine and Metabolic Markers is Associated to More Severe Human Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Neuroimmunomodulation* 2018; 25: 119-128.
43. Mocelin AO, Issa VS, Bacal F, Guimarães GV, Cunha E, Bochi EA. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: A prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*, 2005; 7: 869-873.
44. Dutra WO, Menezes CAS, Magalhaes LMD, GOLLOB KJ Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite immunol*, 2014; 36: 377–387.
45. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC *et al.* Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Osw Cruz*, 2009; 104: 252-258.
46. Curvo EO, Ferreira RR, Madeira FS, *et al.* Correlation of transforming growth factor- β 1 and tumour necrosis factor levels with left ventricular function in Chagas disease. *Mem Ins Oswaldo Cruz*, 2018; 113: 1-8.
47. Ward LS, Guariento ME, Fernandes GA, Maciel RMB. Serum cytokines in chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bra Med Trop* 1999; 32: 285-289.
48. Miller MJ, Wrightsman RA, Manning JE. *Trypanosoma cruzi*: Protective Immunity in Mice Immunized with Paraflagellar Rod Proteins Is Associated with a T-Helper Type 1 Response. *Exp Parasitol*, 1996; 84: 156-167.
49. Pisseti CW, Correia D, Braga TT, *et al.* Association between the plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. *Rev Soc Bra Med Trop*, 2009; 42: 425-430.
50. Joyce DA, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M, Brennan FM. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2699-2705.
51. Lorena VMB, Verçosa AFA, Machado RCA, *et al.* Cellular Immune Response From Chagasic Patients to CRA or FRA Recombinant Antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clin Lab Ana*, 2008; 22: 91-98.
52. Pisseti CW, Correia D, Oliveira RFD, *et al.* Genetic and Functional Role of TNF- α in the Development *Trypanosoma cruzi* Infection. *Plos Negl Trop Dis* 2011; 5: e976.

8 CONCLUSÃO

Os achados sugerem a importância do balanço endógeno dos receptores solúveis de TNF- α , indicando proteção (contra efeitos deletérios do TNF) nos pacientes com doença de Chagas crônica. O sTNFR1 parece ter maior influência na infecção crônica, pois seus níveis sorológicos aumentaram gradualmente de acordo com os estágios de envolvimento cardíaco, tanto individual, quanto correlacionados (sTNFR1 *versus* sTNFR2). Além disso, revela equilíbrio imunológico durante a forma indeterminada, pela correlação negativa com o TNF- α . Esse equilíbrio também foi verificado pela ausência de significância estatística com dados da %FEVE.

Sendo assim, estudos mais detalhados como a avaliação concomitante desses receptores com o perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias, a avaliação dos receptores em células de sangue periférico provenientes de portadores crônicos, a verificação da frequência deles na apoptose dessas células, além de análises após bloqueio com drogas inibidoras de TNF merecem destaque, e contribuiriam para um melhor entendimento da imunopatologia da doença de Chagas humana.

REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J.C.S. *et al.* Modulation of Chemokine Production and Inflammatory Responses in Interferon- γ - and Tumor Necrosis Factor-R1-Deficient Mice during *Trypanosoma cruzi* Infection. **The American Journal of Pathology**, Nova Iorque, v. 158, n. 4, p.1433-1440, 2001.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W, O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, n. 7, p. 3010-3010, 2014.
- ARAÚJO, F.F. *et al.* Regulatory T Cells Phenotype in Different Clinical Forms of Chagas' Disease. **Plos Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 5, n. 5, p.1-8, 2011.
- ARGOLO, A. M. *et al.* **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Rio de Janeiro. Imperial Novo Milênio, 2008.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BERN, C.; MARTIN, D. L.; GILMAN, R.H.. Acute and Congenital Chagas Disease. In: WEISS, Louis M.; TANOWITZ, Herbert B.; KIRCHHOFF, Louis V. (Ed.). **Chagas Disease, Part A**. Londres: Elsevier, 2011. Cap. 2. p. 19-47.
- BILATE, A.M.B. *et al.* TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Microbes And Infection**, Paris, v. 9, n. 9, p.1104-1113, 2007.
- BILBE, G.. Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. **Science**, Washington, v. 348, n. 6238, p.974-976, 2015.
- BLACK, R. A. *et al.* Relaxed Specificity of Matrix Metalloproteinases (MMPS) and TIMP Insensitivity of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Production Suggest the Major TNF- α Converting Enzyme Is Not an MMP. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 225, n. 2, p.400-405, 1996.
- BOCCHI, E. A. *et al.* Chronic Chagas Heart Disease Management. **Journal of the American College of Cardiology**, Nova Iorque, v. 70, n. 12, p. 1510–1524, 2017.
- BRASIL. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016, Brasília, v. 50, n. 2, p. 1-10, 2019. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude>>. Acesso em: 30 jan. 2019.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T.. Immunological Control of *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basileia, v. 114, n. 2, p.103-110, 1997.

BRODSKY, C. I.; BARRAL-NETO, M. Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 10, p. 170-176. 2000.

CARPENTIER, I.; COORNAERT, B.; BEYAERT, R. Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2. **Current medicinal chemistry**, Schiphol, v. 11, n. 16, p. 2205–2212, 2004.

CARSWELL, E.A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v.72, n. 9, p. 3666–3670, 1975.

CASTAÑOS-VELEZ *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 6, 2960-2968, 1998.

CASTRO, I. *et al.* I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 97, n. 2, p. 01-48, 2011.

CHAVES, A.T. *et al.* Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. **Bmc Infectious Diseases**, Londres, v. 16, n. 1, p.1-11, 2016.

COSTA, G.C. *et al.* Functional IL-10 Gene Polymorphism Is Associated with Chagas Disease Cardiomyopathy. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 199, n. 3, p.451-454, 2009.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, Basileia, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.

CUELLAR, A. *et al.* Natural CD4+ T-cell responses against *Trypanosoma cruzi* KMP-11 protein in chronic chagasic patients. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 87, n. 2, p.149-153, 2008.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Cardiac Gene Expression Profiling Provides Evidence for Cytokinopathy as a Molecular Mechanism in Chagas' Disease Cardiomyopathy. **The American Journal of Pathology**, Nova Iorque, v. 167, n. 2, p.305-313, 2005.

DEROUICH-GUERGOUR *et al.* Tumour necrosis factor α receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. **International Journal For Parasitology**, Nova Iorque, v. 31, n. 8, 763-769, 2001.

DIAS, J.C.P. **Doença de Chagas em Bambuí - Minas Gerais. Brasil. Estudo Clínico-Epidemiológico a partir da fase aguda entre 1940 e 1982.** 1982. 376 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, 1982.

DIAS, J.C.P. Chagas disease: still a challenge around the World. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 48, n. 4, p.367-369, 2015.

DIAS, J.C.P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. 21, p.1-10, 2016.

DIAS, J.C.P; AMATO NETO, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *trypanosoma cruzi* no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 68-72, 2011.

DUTRA, W. O. *et al.* Cytokine mRNA Profile of Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated from Individuals with *Trypanosoma cruzi* Chronic Infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 45, n. 1, p.74-80, 1997.

DUTRA, W.O. *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 208-218, 2009.

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

FERREIRA, R. C. *et al.* Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/ "indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p.407-412, 2003.

GARCÍA, M. M. *et al.* Soluble Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors (sTNF-R1 and -R2) in Pregnant Women Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi* and their Children. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Illinois, v. 78, n. 3, p. 499-503, 2008.

GOMES, J. A. S. *et al.* Evidence that Development of Severe Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease Is Due to a Th1-Specific Immune Response. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 3, p.1185-1193, 2003.

GONZÁLEZ, F. *et al.* Dysregulated Network of Immune, Endocrine and Metabolic Markers is Associated to More Severe Human Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Neuroimmunomodulation**, Basileia, v. 25, n. 3, p.119-128, 2018.

GRAUERT, M. R.; HOUDAYER, M.; HONTEBEYRIE-JOSKOWCIZ, M.. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. **Clinical and Experimental Immunology**, Londres, v. 93, n.1, p.85-92, 1993.

GUEDES, P. M. M. *et al.* Inflammation Enhances the Risks of Stroke and Death in Chronic Chagas Disease Patients. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 4, p.1-18, 2016.

GUTIERREZ, F. R. S. *et al.* The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, n. 11, p.673-685, 2009.

HAWKING, S.W. Eutanásia - People Daily Online. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-43401664>> Acesso em: 23 de março de 2019

HOTEZ, P.J. *et al.* The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 2, n. 9, e300, 2008.

ISSUREE, P. D. A. *et al.* IRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, Nova Iorque, v. 123, n. 2, p.1-5, 2013.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B.. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Rheumatology**, Londres, v. 12, n. 1, p.49-62, 2015.

KIM, H.L. *et al.* Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors and Arterial Stiffness in Patients with Coronary Atherosclerosis. **American Journal of Hypertension**, Nova Iorque, v. 30, n. 3, p.313-318, 2016.

KROLL-PALHARES, K. *et al.* TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF- α blockade. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 4, p. 375-385, 2008.

LANNES-VIEIRA, J. *et al.* TNF- α and TNFR in Chagas Disease: From Protective Immunity to Pathogenesis of Chronic Cardiomyopathy. In: WALLACH, David; KOVALENKO, Andrew; FELDMANN, Marc. **Advances in TNF Family Research**. Nova Iorque: Springer, New York, Ny, p. 221-230, 2009.

LIDANI, Kárita C. F. *et al.* The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p.1-14, 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>.

MACHADO, F. S. *et al.* Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Frontiers in bioscience**, Tampa, v. 4, p. 1743–1758, 2012a.

MACHADO, F. S. *et al.* Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in Immunopathology**, Berlim, v. 34, n. 6, p. 753–770, 2012b.

MACEWAN, D.J. TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences. **Cellular Signalling**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 477-492, 2002.

MAGALHÃES, L. M. D. *et al.* High Interleukin 17 Expression Is Correlated With Better Cardiac Function in Human Chagas Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 207, n. 4, p.661-665, 2012.

MAGALHÃES, L. M. D. *et al.* Distinct *Trypanosoma cruzi* isolates induce activation and apoptosis of human neutrophils. **Plos One**, San Francisco, v. 12, n. 11, p.1-17, 2017.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E. A. The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease. **Clinical Cardiology**, Nova Iorque, v. 38, n. 9, p. 565–569, 2015.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, Dallas, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 2007.

MATTU, U. K. *et al.* The Assassin: Chagas Cardiomyopathy. **The American Journal of Medicine**, Nova Iorque, v. 126, n. 10, p.864-867, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, p. 1-29, 2005.

MOCELIN, A. O. *et al.* The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: A prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. **European Journal of Heart Failure**, Nova Iorque, v. 7, n. 5, p.869-873, 2005.

MONDEN, Y. *et al.* Tumor necrosis factor- is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 293, n. 1, p.743-753, 2007.

MOSS, M. L. *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . **Nature**, Londres, v. 385, n. 6618, p.733-736, 1997.

NÓBREGA, A. A. *et al.* Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 4, p.653-655, 2009.

PARK, M. *et al.* Associations of tumor necrosis factor alpha receptor type 1 with kidney function decline, cardiovascular events, and mortality risk in persons with coronary artery disease: Data from the Heart and Soul Study. **Atherosclerosis**, Amsterdã, v. 263, p.68-73, 2017.

PEREIRA, I. R. *et al.* Tumor Necrosis Factor Is a Therapeutic Target for Immunological Unbalance and Cardiac Abnormalities in Chronic Experimental Chagas' Heart Disease. **Mediators of Inflammation**, Nova Iorque, v. 2014, p.1-16, 2014.

PÉREZ, A. R. *et al.* Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. **Brain, Behavior, And Immunity**, San Diego, v. 21, n. 7, p.890-900, 2007.

PÉREZ, A. R. *et al.* Short treatment with the tumour necrosis factor- α blocker infliximab diminishes chronic chagasic myocarditis in rats without evidence of *Trypanosoma cruzi* reactivation. **Clinical & Experimental Immunology**, Londres, v. 157, n. 2, p.291-299, 2009.

PÉREZ, A. R. *et al.* Death of adrenocortical cells during murine acute *T. cruzi* infection is not associated with TNF-R1 signaling but mostly with the type II pathway of Fas-mediated apoptosis. **Brain, Behavior, And Immunity**, San Diego, v. 65, p.284-295, 2017.

PEREZ-MOLINA, J.A; MOLINA, J. Chagas Disease. **The Lancet**, Londres, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2017.

PINHEIRO, E. *et al.* Chagas disease: Review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 50, n. 3, p. 296–300, 2017.

PIRCHER, J. *et al.* Prothrombotic effects of tumor necrosis factor alpha *in vivo* are amplified by the absence of TNF-alpha receptor subtype 1 and require TNF-alpha receptor subtype 2. **Arthritis Research & Therapy**, Londres, v. 14, n. 5, 2012.

RAMÍREZ-TOLOZA, G.; FERREIRA, A.. *Trypanosoma cruzi* Evades the Complement System as an Efficient Strategy to Survive in the Mammalian Host: The Specific Roles of Host/Parasite Molecules and *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p.1-13, 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01667>.

RASSI, A. *et al.* Clinical phases and forms of Chagas disease. In: TELLERIA, Jenny; TIBAYRENC, Michel. **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research**. 2. ed. Cambridge: Academic Press, 2017. p. 653-684.

RASSI Jr. A.; RASSI, A.; LITTLE, W.C. Chagas' Heart Disease. **Clinical Cardiology**, Nova Iorque, v.23, p. 883-889, 2000.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, Filadélfia, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, Londres, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RASSI A Jr, RASSI A, RASSI SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, Dallas, v.115, n: 9, p.1101-1108, 2007.

RIBEIRO, A. L. *et al.* Diagnosis and management of Chagas disease and

cardiomyopathy. **Nature Reviews. Cardiology**, Londres, v. 9, n. 10, p. 576–589, 2012.

RIBEIRO, A L.; ROCHA, M. O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 301–314, 1998.

RICHARDSON, P. *et al.* Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. **Circulation**, Dallas, v. 93, n. 5, p.841-842, 1996.

RODRIGUES, D. B. R. *et al.* In Situ Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells in Chagas' Disease Patients with Heart Failure. **Clinical And Developmental Immunology**, Abingdon, v. 2012, p.1-7, 2012.

SALTIEL, A. R.. New Perspectives into the Molecular Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. **Cell**, Cambridge, v. 104, n. 4, p.517-529, 2001.

SAFRANOW, K. *et al.* Plasma concentrations of TNF- α and its soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 in patients with coronary artery disease. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 74, n. 5, p.386-392, 2009.

SATHLER-AVELAR, R. *et al.* Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: What must be understood?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 246–251, 2009.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, Basileia, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SEDDER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 453–472, 2014.

SOUZA, P. E. A. *et al.* Monocytes from Patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity. **Infection And Immunity**, Washington, v. 72, n. 9, p. 5283-5291, 2004.

SOUZA, P. E. A. *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. **Infection And Immunity**, Washington, v. 75, n. 4, p.1886-1894, 2007.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges. **Global Heart**, Reino Unido, v. 10, n. 3, p. 139–144, 2015.

TALVANI, A. *et al.* Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99 p. 645– 649, 2004.

TARTAGLIA, L. A. *et al.* A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. **Cell**, Cambridge, v. 74, n. 5, p.845-853, 1993a.

TARTAGLIA, L.A.; PENNICA, D.; GOEDDEL, D.V. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.268, n.25, p.18542-18548, 1993b.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, Oxford, v. 82, n. 974, p. 788–798, 2006.

TRUYENS, C. *et al.* The endogenous balance of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor modulates cachexia and mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 11, 5579-5586, 1999.

TSAI, E. Y. *et al.* Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. **Molecular And Cellular Biology**, Washington, v. 16, n. 10, p.5232-5244, 1996.

VAN ZEE, K J *et al.* Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 89, n. 11, p.4845-4849, 1992.

VILLAR, Silvina R. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Regulates Glucocorticoid Synthesis in the Adrenal Glands of *Trypanosoma cruzi* Acutely-Infected Mice. The Role of TNF-R1. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 5, p.1-13, 2013.

WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 90, n. 6, p. 33–44, 2015.

WHO. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/77950>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

WHO. **Chagas Disease (American trypanosomiasis)**. 2019. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 28 out. 2018.

APÊNDICE

APÊNDICE A – ARTIGO

Levels of soluble receptors of TNF (sTNF-R1 and sTNF-R2) are increased in serum of chronic Chagas disease patients

D.J.L. TORRES*, J.P.GONÇALES†, T.R. DE ARRUDA, M. DA S.BARROS*, Y. DE M. GOMES*
V.M.B. LORENA*

* Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Foundation Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brazil

† Virology Section, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Correspondence to: V.M.B. LORENA, Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil, CEP: 50740-465.
E-mail: lorena@cpqam.fiocruz.br.

Abstract

Soluble TNF receptors (sTNFR1 and sTNFR2) are considered endogenous natural inhibitors of TNF and are elevated in many inflammatory, autoimmune and chronic diseases. The immunological mechanisms involved in the evolution of clinical forms in chronic carriers of Chagas' disease remain unclear. Tumor necrosis factor (TNF), the most pleiotropic cytokine of the immune system, is considered one of the keys in Chagas disease immunopathology. Our objective was to evaluate TNF, sTNFR1 and sTNFR2 in the serum of chronic carriers of Chagas' disease. A total of 133 patients were included, of which 51 were undetermined (IND), 39 were mild (CARD 1) and 43 were cardiac (CARD 2), and 20 uninfected individuals (NI). The results indicate that the soluble receptors act on the regulation of TNF in Chagas' disease, because its serum levels are high in these carriers when compared to non-infected individuals, although there is no statistical difference between the carriers, sTNFR1 increased according to severity of the disease. In addition, we found a negative correlation between sTNFR1 and TNF in individuals with the IND form, suggesting that this relationship may prevent progression to more severe forms, such as cardiac form. sTNFR1 and sTNFR2 are elevated in all clinical forms, but with a moderate positive correlation in the most severe patients ($r: 0.50$ and $p: 0.0005$). The findings suggest the importance in endogenous balance of soluble TNF receptors, and may indicate protection and balance in patients with chronic Chagas' disease. In

addition, the TNF / TNFR1 pathway seems to have a major contribution to the chronic course of the disease.

1 | INTRODUCTION

It is estimated that Chagas' disease, caused by the hemoflagellate *Trypanosoma cruzi*, affects more than 8 million people around the world^{1,2} and that approximately 70 million people are at risk of infection.^{3,4} It has distribution in more than 21 countries of Latin America causing more than 10,000 deaths a year being a serious public health problem in Brazil due to the current outbreaks of oral infection, necessitating urgent sanitary measures.^{3,5}

The indeterminate form is responsible for most cases, 70%, where the patient has the same life expectancy of a person without the disease, these individuals present reactive serological tests, but they have normal imaging tests and absence of clinical symptoms.^{5, 6,7}

Chronic heart disease or chronic chagasic cardiopathy (CCC) is the most serious and major chronic manifestation responsible for mortality in the disease, affecting about 30% of the individuals.⁸ The intense inflammatory infiltrate in front of the parasite contributes to its decrease both in the systemic and in the tissue level.⁹ However, due to the persistence of the parasite (in organs such as the heart) in the chronic phase, a cellular immune response is assembled leading to exhaustive tissue damage without repair.⁹

It is not known what the mechanisms involved in the clinical evolution of the patient from the indeterminate form to the symptomatic form, but it is believed that the immune response to the protozoan has an important contribution. The cytokines produced by activated lymphocytes regulate the immune response and are implicated both in resistance to infection and in the clinical evolution of patients with Chagas' disease.¹⁰ Analyses of pro-and anti-inflammatory cytokine profiles suggest that IL-10 is higher in individuals with an indeterminate form when compared to the cardiac form.

In contrast, proinflammatory cytokines, such as interferon gamma (IFN- γ)^{11,12}, tumor necrosis factor (TNF)¹³⁻¹⁴ and IL-17¹⁵ are at higher levels in cardiac form and possibly represent a worsening of cardiac function. In addition, elevated levels of TNF were present in individuals with Chagas' heart disease who died of stroke,

suggesting that elevated levels of this cytokine increase the risk of developing stroke and is associated with cardiac worsening.^{13-15, 17}

TNF was described in 1973 as an endotoxin that caused necrosis in tumors in vitro.¹⁸ It is highly inflammatory and is considered the most pleiotropic cytokine, that is, it functions in several cell types. Its role is associated with several parasitic, autoimmune, neoplastic and inflammatory diseases.¹⁹ TNF is a result of cleavage of the TNF-converting enzyme (TACE) and is initially expressed as a transmembrane protein in several immunological cells such as monocytes / macrophages, NK and T lymphocytes, as well as endothelial cells and fibroblasts.^{20,21}

To perform its various functions, complex immunomolecular events occur after binding to its receptors. With the action of TACE, transmembrane TNF (mTNF) is converted to soluble TNF (sTNF), which is the circulating form, with an endocrine capacity to act at distant sites.^{19,22,23} sTNF and TNF bind to their (TNFR1 or CD120a) and type 2 (TNFR2 or CD120b) receptors, where mTNF is more affinity for TNFR2 and sTNF has more affinity for TNFR1. Both receptors are found constitutively in the cells, but TNFR2 has much more restricted expression.²⁴ These receptors are also cleaved and become soluble receptors of type 1 and 2 (sTNFR 1/2), being considered potent natural inhibitors of TNF, a instead of being able to compete for the TNF binding site, preventing its activation.

It has been demonstrated in vivo that the TNF / TNFR1 pathway plays an important role in *T.cruzi* infection, since TNFR1 knockout mice do not survive the infection due to high parasitemia, immune imbalance and cachexia.²⁵⁻²⁹ In addition, soluble receptors limit the deleterious activity of TNF.³⁰ In humans, TNF has been considered a key cytokine in immunopathological mechanisms during the chronic phase of patients with Chagas' disease. Therefore, evaluating soluble receptors, which are considered inhibitors of the cytokine, besides helping to understand this immuno-modulation, can help in the search for immunological biomarkers for the diagnosis, progression and severity of the disease.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Population and place of study

A total of 133 chronic Chagas' disease patients who were treated at the Chagas Disease Outpatient Clinic and Heart Failure of the Pernambuco Cardiovascular Emergency Room (PROCAPE) / University of Pernambuco (UPE) were selected. After signing the informed consent form (EHIC), 10mL of blood was collected for the tests and confirmation of the diagnosis of the infection.

The samples were aliquoted and stored at -20°C in the Sorgue of the Chagas Disease Reference Service (SRDC) of the Aggeu Magalhães Institute (IAM). Confirmation of infection was performed using two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), Elisa conventional, Elisa Chagas III commercial kit (Biochile, Bio Group, Santiago, Chile) and Elisa recombinant, commercial kit Immuno-Elisa Wama (Wama Diagnóstica, São Carlos, Brazil) according to the guidelines of the manufacturers and according to the II Brazilian Consensus on Chagas disease.

Individuals who received prior treatment with Benzonidazole and / or who had digestive complaints were excluded from the study. Selections and classification were performed by cardiologists from PROCAPE, following the I Latin American Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas Cardiomyopathy.³¹ Subjects were included in the study after confirmation of serological tests and positivity on imaging tests such as echocardiogram), Electrocardiogram (ECG), X-ray of Thorax and Esophagus. Thus, patients were classified as A or undetermined form (IND) (n = 51), without cardiac symptoms and with normal ECG and ECHO; B1 or mild cardiac form (CARD 1) (n = 39), with structural heart disease, evidenced by ECG or ECHO, but with normal global ventricular function and without current and previous signs and symptoms of congestive heart failure (CHF); C or severe cardiac form (CARD 2) (n = 43) with ventricular dysfunction and current or previous symptoms of CHF (Table 1). In addition, 20 non-infected individuals (NI) were included in the study as controls that could not have inhabited an area endemic to Chagas' disease; never having received blood transfusion; presented non-reactive serological test for Chagas' disease and did not present leukocyte alteration in the hemogram.

Table 01. Characterization of patients

	NI	IND	CARD 1	CARD 2
Number of patients	20	51	39	43
Age (years)*	24.6 ± 6.2	53.2 ± 11.2	62.0 ± 9.3	58.9 ± 10.4
Sex				
Male	10	19	13	19
Female	10	32	26	24
LVEF Echocardiography (%)*	-	66.9 ± 5.0	63.2 ± 7.4	39 ± 12.9

NI: not infected; IND: indeterminate form; CARD 1: mild cardiac form; CARD 2: severe cardiac form. *mean ± standard deviation. LVEF: Ejection fraction of left ventricle.

2.2 | Quantification of soluble TNF receptors (sTNFR1 and sTNFR2) and TNF- α in serum samples by Cytometric Bead Array (CBA)

The soluble TNF receptor levels (sTNFR1 and sTNFR2) and TNF- α were quantified in the serum samples of the subjects by the Cytometric Bead Array (CBA) Human Flex, following the manufacturer's instructions (Beckton Dickson). The beads were acquired within 24 hours using the FACScalibur flow cytometer (Beckton Dickson) and analyzed using the FCAP Array Software version 3.01 (Beckton Dickson). The detection limits for TNF, sTNFR1 and sTNFR2 were 3.08, 1.81 and 2.27 pg / mL, respectively.

2.3 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using PRISM 5.0 Windows® software (U.S.A.). The presentation of the variables measured was performed through descriptive measures such as: mean, median and standard deviation. Initially, a normality test (D'Agostino) was applied, where it was verified that the data were non-parametric, later the Kruskal-Wallis was used to evaluate the association between the groups. Once the association was verified, the Mann-Whitney test was used for the quantitative comparisons of the receptors and cytokine between groups. The correlation between TNFR1 / 2 versus TNF- α , TNFR1 versus TNFR2 and TNFR1 / 2, TNF versus% LVEF was assessed using the Spearman non-parametric correlation test. All conclusions were taken at the significance level of 5%.

3 | RESULTS

3.1 | Soluble TNF receptors increase in the serum of patients with Chagas disease

We found that sTNFR1 and sTNFR2 are elevated in chronic carriers of Chagas' disease (IND, CARD 1 and CARD 2) when compared to uninfected individuals (NI) (Fig 1A and 1B). But, no statistically significant difference between the groups studied was observed. On the other hand, we observed that sTNFR1 gradually increases as the disease worsens (Median: IND: 153.3 pg / mL, CARD 1: 167.8 pg / mL, CARD 2: 199.3 pg / mL).

Serum TNF levels remained below the detection limit for TNF (<3.08 pg / mL). However, although there was no statistically significant difference between the groups evaluated, IND individuals had lower TNF levels (Median: 0.39 pg / mL) when compared to uninfected individuals with cardiac form (Median: 0.48 and 0.45 pg / mL, respectively) (Fig. 1C).

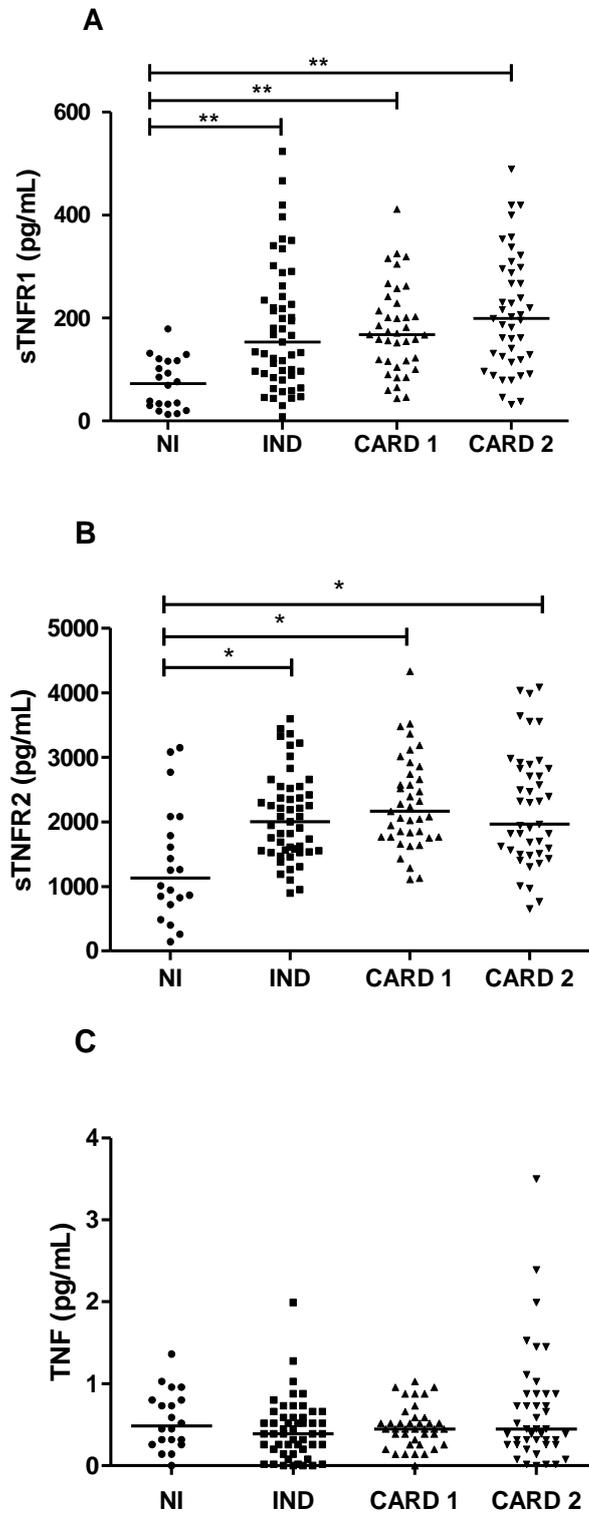


Figure 1. Concentration of TNF and its soluble receptors (sTNFR1 and sTNFR2) in serum from infected and uninfected patients. Legend: NI groups (n = 20), IND (n = 51), CARD 1 (n = 39) and CARD 2 (n = 43). The lines represent the median of each group and the statistical differences are indicated by the bars being represented by * P < 0.05 and ** P ≤ 0,0001.

3.2 | sTNFR1 correlates negatively with TNF in the serum of indeterminate patients, but sTNFR1 and sTNFR2 increase in all clinical forms

We correlate TNF levels with their receptors in the IND and CARD clinical forms (Table 2). We found a low but existing ($r: -0.38$ $p: 0.0058$) negative correlation between sTNFR1 and TNF, suggesting that as sTNFR1 increases, TNF levels decrease in IND carriers of Chagas' disease. There was no significant correlation between sTNFR2 / TNF in chronic carriers and nor between sTNFR1 / TNF in CARD 1 and CARD 2 carriers. When correlating sTNFR1 versus sTNFR2, we found a positive correlation, but CARD 2 presented a higher R when compared to sTNFR1 versus sTNFR2. IND and CARD 1, being therefore a moderate correlation (Fig 2A, B and C).

Table 2 - Correlation between the serological concentration of sTNFR1 / 2 and TNF in chronic carriers of Chagas disease

	IND		CARD 1		CARD 2		ALL	
	r	p	r	p	r	p	r	p
sTNFR1 vs TNF	-0,38	0,0058	-0,16	0,3256	-0,06	0,6756	-0,20	0,0208
sTNFR2 vs TNF	-0,24	0,0820	0,22	0,5251	-0,23	0,1362	-0,12	0,1537

Legend: r: rank de Spearman; p: *p value*

To evaluate the relationship between TNF receptors and the degree of cardiac dysfunction, we correlated the left ventricular ejection fraction (% LVEF) with no significant correlation.

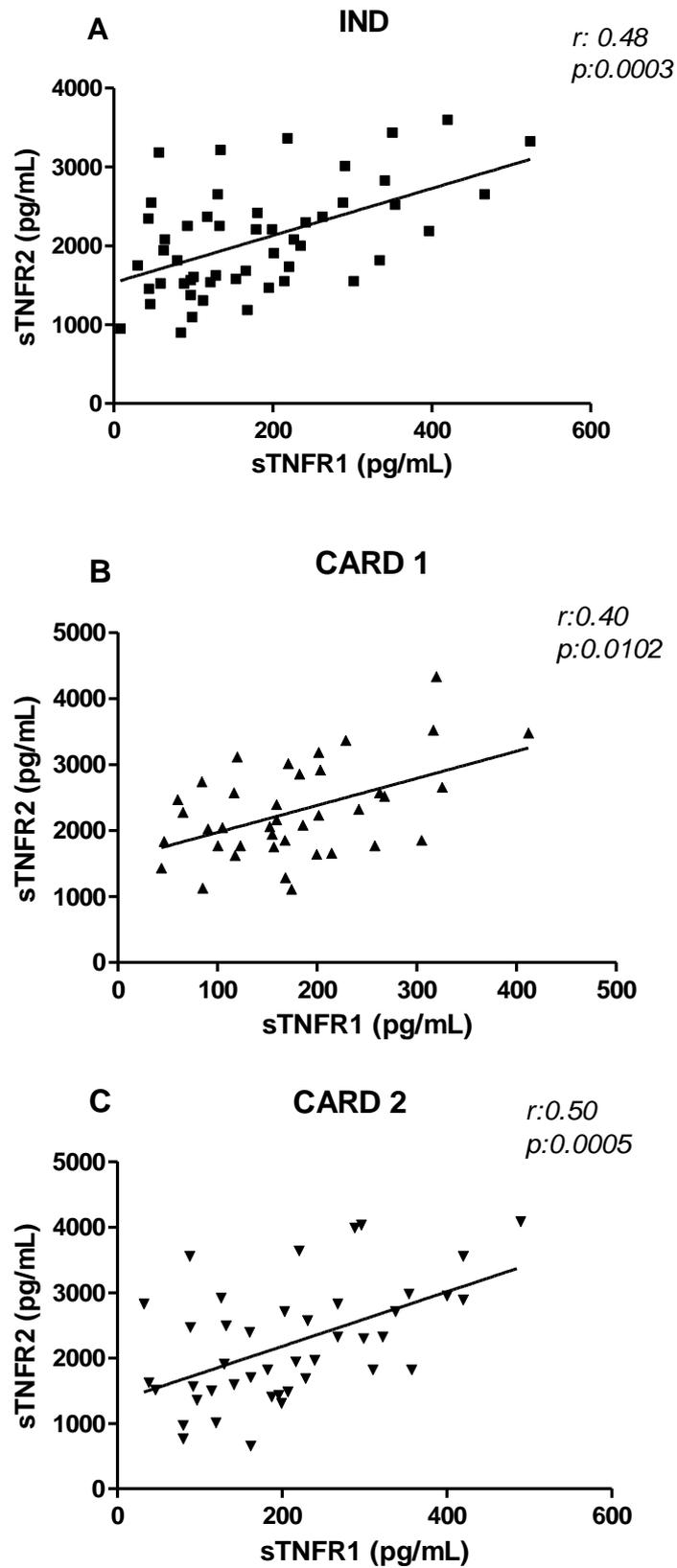


Figure 2. Correlations between the serological concentrations of sTNFR1 and sTNFR2 in chronic carriers of Chagas' disease. Legend: The line represents the linear regression for each comparison; CARD 1: mild cardiac shape; CARD 2: severe cardiac shape.

4 | DISCUSSION

The TNF / TNFR1 pathway plays an important role in *T. cruzi* infection, as it has an important role in the control of parasitemia and has an impact on the induction of inflammation, cachexia and survival of infected animals.²⁵⁻²⁹ The soluble TNF α receptors (sTNFR1 and sTNFR2) aims to neutralize the cytokine and are considered potent natural endogenous inhibitors of TNF.³² Our goal was to dose these receptors in serum of chronic carriers of Chagas' disease, in order to understand their role in mechanisms that aid or inhibit harmful TNF and whether they could become immunological biomarkers of severity and / or prognosis.

The results showed that soluble TNF receptors are at higher levels in the serum of patients with chronic Chagas' disease when compared to uninfected individuals. This increase is expected since Chagas' disease is a chronic inflammatory pathology corroborating with studies in some autoimmune, inflammatory and chronic diseases^{33,34,35} besides parasitic and³⁶ oncohematologic infections.³⁷ Plasma levels of sTNFR1 / 2 are elevated in patients with visceral leishmaniasis, with a strong positive correlation between these receptors in the affected individuals.³⁸ sTNFR1 levels in cell culture supernatant of individuals with active cutaneous leishmaniasis were higher when compared to controls and significantly decreased after treatment.³⁹

We found a moderate correlation of these receptors in the chronic clinical forms of Chagas' disease. However the correlation of sTNFR2 vs sTNFR1 was stronger in the cardiac form more severe when compared to light cardiac. We believe that this increase may have regulatory effects on TNF activity and thereby prevent or attenuate its deleterious actions on the cardiac tissue of chronically infected individuals.

Our findings corroborate with some *in vivo* and *ex vivo* studies where sTNFR2 levels are much higher in plasma and serum from infected animals and humans.^{30,40} González et al. (2018) found that TNFR2 levels were higher in peripheral blood cells of indeterminate and cardiac carriers when compared to uninfected ones. On the other hand, the authors did not find statistically significant differences in plasma levels of TNF or TNFR1 among chronic carriers of the different clinical forms or when these were compared to the individuals in the control group.⁴²

Mocelin et al. (2005) found no statistically significant difference in assessing plasma levels of sTFNR1 between chronic carriers of Chagas disease and

individuals without infection. The small number of patients (28) and the technique used by the authors may have been biases for the study. To evaluate the soluble and TNF receptors we used CBA, which is more sensitive than Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).⁴³

The TNF / TNFR1 pathway appears to be the most important in *T. cruzi* infection, both in the acute and chronic phases. Having an impact on the parasite control, survival and inflammation of infected animals.²⁵⁻²⁹ The cellular and humoral immune response in TNFR1^{-/-} mice is dysregulated during infection, therefore, cells from TNFR1 deficient animals do not show good trypanocidal capacity, besides the low production of IgG.²⁵

TNFR1 is important in the recruitment of neutrophils and macrophages, but not lymphocytes to the site of inoculum, since TNFR1-deficient mice did not present these cells of the innate immune response at the inoculum sites.²⁶ In contrast, cardiac tissues of TNFR1^{-/-} mice presented a decrease in TCD4 and TCD8 lymphocytes, demonstrating the role of the receptor in the induction of myocarditis, mainly composed of lymphocytes during acute infection.^{26,28} Although we did not study the expression of transmembrane receptors (mTNFR) a statistically significant difference between the clinical forms of Chagas disease, sTNFR1 rises according to the severity of the disease.

Although TNF plays a beneficial role during the acute phase in infected animals, it also triggers harmful effects such as cachexia and death. These effects are limited by the endogenous action of their soluble receptors and determine the outcome of the infection.³⁰ sTNFR2 was most associated with TNF cytokine neutralizing activity in mouse plasma. Low sTNFR / TNF ratios were associated with mortality and cachexia in untreated infected animals treated with TNF anti-TNF antibody.³⁰

We performed a correlation between sTNFR1 and TNF in individuals with the chronic clinical forms of the disease and found a moderate and negative correlation where increased sTNFR1 levels were associated with a decrease in TNF, these findings may support the idea that the sTNFR1 receptor is regulating the activity of TNF in the individuals with the indeterminate form being able to diminish its deleterious effects in the organs like heart or even to prevent the evolution to more severe forms of the disease since the indeterminate form represents a balance between host and parasite and the cardiac forms an imbalance.⁴⁴

Some human studies using plasma or culture supernatants have shown that TNF levels rise in patients with chronic Chagas' heart disease when compared to patients with the indeterminate form and that this increase is directly related to cardiac damage.^{13,14, 15} We found no significant differences in TNF levels. To rule out the hypothesis that there was degradation of the cytokine during the experiment time, we plot only samples that were thawed at none or only once. We also removed the possibility of some defect on the CBA Flex TNF kit, since the curve was linear with a correlation coefficient (R²) of 98.96%. However, we also believe in TNF consumption in the inflamed sites of the body, especially in patients with Chagas' heart disease, where the median was lower when compared to non-infected individuals.

Minor amounts of TNF in IND individuals can also be explained by the greater neutralization of sTNFR1 on TNF, since we found a negative correlation between sTNFR1xTNF in the IND individuals group. We also believe in the effects of blood thinning and that a focused release of TNF in some organs may not reflect at circulatory levels.^{15,40}

Ward et al. (1999) measured the serum levels of IL-2, IFN- γ and TNF in 91 patients with Chagas disease in their different clinical forms. There was no difference in cytokine levels between carriers and between controls. Serum TNF levels were undetectable and IFN- γ did not differ in the different clinical forms or severity of the disease. The results, besides corroborating with these findings, show that in the IND form, TNF levels were the lowest. Patients with the IND form have a more anti-inflammatory profile with persistence of the parasite^{12,45,46} and may also be related to the lack of activation of a Th1 profile and this may have some cardiac involvement since the protective immunity is related to an increase in response type Th1.^{47,48}

Pisseti et al. (2009) found that plasma levels of IFN- γ , IL-10 and TNF did not show statistically significant differences between controls and seropositive individuals. In contrast, IL-10 increased in chronic carriers when compared to healthy carriers, and that this increase draws attention to immunomodulatory properties with regulation of the inflammatory process and escape of the parasite.⁴⁹ IL-10 acts by inhibiting the proinflammatory activity of TNF indirect manner by the increase of soluble receptors and decrease of transmembrane receptors or directly by inhibition of TNF release.⁵⁰ Analysis in culture supernatant revealed that only the mitogenic stimulus was essential for the production of TNF in infected individuals. Even after the dependent stimulus (with Epimastigote antigens (Epi) there was no statistical difference.^{51,52}

These findings suggest the importance of the endogenous balance of soluble TNF receptors, and may indicate protection in patients with chronic Chagas' disease. In addition, the TNF / TNFR1 pathway appears to be paramount in the chronic course of the disease in humans. More detailed studies, such as evaluation of these receptors in peripheral blood cells from chronic carriers, study of cytokine profiles, frequency of receptors involved in apoptosis, and analysis of these cells after blockade with TNF inhibitor drugs are highlighted and would contribute to the understanding of immunopathology of chronic Chagas' disease.

Ethics statement

All uninfected and infected individuals signed a free and informed consent form prior to collection and thus voluntarily participated in the study, in which a questionnaire was applied to information such as age, sex, whether the patient received etiologic treatment or whether it was done use of some medication for the heart. The study was carried out following all the ethical research protocols in humans with approval from the Aggeu Magalhães Institute's ethics committee (0032.0.095.000-10).

Authors' contributions

All authors contributed directly to the work. GOMES YM yielded the samples for the experiments. DE ARRUDA TR carried out the dosages by the CBA. GONÇALES JP and BARROS MS contributed with analyzes and interpretations of the data. TORRES DJL and LORENA VMB contributed in all the questions from the experiments until the writing of this article.

Acknowledgement

The authors are grateful to all the patients who volunteered in the study and to the Chagas Disease Outpatient Clinic and Heart Failure of the Pernambuco Cardiac Emergency Room (PROCAPE). Aggeu Magalhães Institute for all technical and scientific support, the Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES), the National Council for Technological Development (CNPq) (Universal /

CNPq 474926 / 2012-5) and the Research of the Foundation of Support to Science and Technology of Pernambuco (Proep-Facepe APQ-1703-2.11 / 15) by the financial support.

Declaration of conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest

References

1. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*, 2010;115: 14–21.
2. World Health Organization. Chagas Disease. 2019. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 28 out. 2018.
3. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases 2013.
4. Bilbe, G. Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. *Science*, 2015; 348: 974-976.
5. World health organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 2015; 33–44
6. Carlos pinto dias, J. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 2016; 25: 1–10.
7. Ribeiro, A L.; Rocha, M. O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 1998; 31: 301–314.
8. Rassi Jr. A, Rassi A, Little WC. Chagas heart disease. *Clin Cardiol*, 2000; 23: 883-889.
9. Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol* 2009; 31: 673-685.
10. Brodskyn, C. I.; Barral-neto, M. Resposta imune humana na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000: 170-176.

11. Keating SM, Deng X, Fernandes F, Cunha-Neto E *et al.* Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. *Int J Cardiol*, 2015; 199: 451-459.
12. Souza GR, Gomes JAS, Fares RCG *et al.* Plasma Cytokine Expression Is Associated with Cardiac Morbidity in Chagas Disease. *Plos One*, 2014; 9: 1-9.
13. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LCJ *et al.* Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/ "Indeterminate" and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2003; 98: 407-412.
14. Talvani A, Rocha MOC, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor— α in Chagasic Cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 943-950.
15. Rodrigues DBR, Dos reis MA, Romano A, *et al.* In Situ Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells in Chagas' Disease Patients with Heart Failure. *Clin Dev Immunol*, 2012; 2012: 1-7.
16. Almeida MS, Lorena VMB, Medeiros CA, *et al.* Alternative Th17 and CD4+ CD25+ FoxP3+ cell frequencies increase and correlate with worse cardiac function in Chagas cardiomyopathy. *Scand J Immunol*, 2018; 87: 1-11.
17. Guedes PMM, De andrade CM, Nunes DF *et al.* Inflammation Enhances the Risks of Stroke and Death in Chronic Chagas Disease Patients. *Plos Negl Trop Dis*, 2016;10: 1-18.
18. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci*, 1975; 72: 3666–3670.
19. Sedger LM, Mcdermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014; 25: 453–472.
20. Tsai EY, Yie J, Thanos D, Goldfeld AE. Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol Cell Biol*, 1996; 16: 5232-5244.
21. Issuree PD, Marezky T, Mcilwain DR *et al.* IRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2013; 25: 1-5.
22. Black RA, Durie FH, Otten-Evans C *et al.* Relaxed Specificity of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and TIMP Insensitivity of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) Production Suggest the Major TNF- α Converting Enzyme Is Not an MMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996; 225: 400-405.
23. Moss, ML, Jin SL, Milla ME *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, 1997 ; 385 : 733-736.

24. Carpentier I, Coornaert B, Beyaert R. Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2. *Curr med chem*, 2004; 11: 2205–2212.
25. Castaños-Velez E, Maerlan S, Osorio LM *et al.* *Trypanosoma cruzi* Infection in Tumor Necrosis Factor Receptor p55-Deficient Mice. *Infect Immun*, 1998; 66: 2960-2968.
26. Aliberti JCS, Souto JT, Marino APMP *et al.* Modulation of Chemokine Production and Inflammatory Responses in Interferon- γ - and Tumor Necrosis Factor-R1-Deficient Mice during *Trypanosoma cruzi* Infection. *Am J Pathol* 2001; 158: 1433-1440.
27. Pérez AR, Roggero E, Nicora A, *et al.* Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. *Brain Behav and Immun* 2007; 21: 890-900.
28. Kroll-palhares K, Silvério JC, Da silva AA *et al.* TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF- α blockade. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2008; 103: 375-385
29. Villar SR, Ronco MT, Bussy RF *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Regulates Glucocorticoid Synthesis in the Adrenal Glands of *Trypanosoma cruzi* Acutely-Infected Mice. The Role of TNF-R1. *Plos One*, 2013; 8: 1-13.
30. Truyens C, Torrico F, Lucas R, De Baetselier P, Buurman WA, Carlier Y. The Endogenous Balance of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors and Tumor Necrosis Factor Modulates Cachexia and Mortality in Mice Acutely Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 1999; 67: 5579-5586.
31. Andrade JP, Marin-neto JA, Paola AAV, *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. *Arq Bras Cardiol*, 2011; 97: 1-48.
32. Van Zee, KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 4845-4849.
33. Safranow K, Dziedziejko V, Rzeuski R *et al.* Plasma concentrations of TNF- α and its soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 in patients with coronary artery disease. *Tissue Antigens*, 2009; 74: 386-392.
34. Kim HL, Lee JP, An JN *et al.* Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors and Arterial Stiffness in Patients With Coronary Atherosclerosis. *Am J Hypertens*, 2016; 1-6.

35. Arias J, Valero N, Mosquera J, *et al.* Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology* 2014; 452-453: 42-51.
36. Bessa TF, Cordeiro CA, Gonçalves RM, *et al.* Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor-2 (sTNFR2) in patients with active toxoplasmic retinochoroiditis. *Braz J Infect Dis*, 2012; 16: 540-544.
37. Vinante F, Rigo A, Tecchio C, *et al.* Serum levels of p55 and p75 soluble TNF receptors in adult acute leukaemia at diagnosis: correlation with clinical and biological features and outcome. *Br J Haematol* 1998; 102: 1025-1034.
38. Medeiros IM, Reed S, Castelo A, Salomão R. Circulating levels of sTNFR and discrepancy between cytotoxicity and immunoreactivity of TNF- α in patients with visceral leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 34-37.
39. Rostami MN, Jasbi ES, Khamesipour A, Mohammadi AM. Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α) and its soluble receptor type 1 (sTNFR I) in human active and healed leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2016; 38: 255-260.
40. García MM, De rissio AM, Villalonga X, Mengoni E, Cardon LR. Soluble Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptors (sTNF-R1 and -R2) in Pregnant Women Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi* and their Children. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2008; 78: 499-503.
41. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, *et al.* Plasma Cytokine Parameters and Mortality in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation* 2000; 102: 3060-3067.
42. González F, Villar S, D'Attilio, *et al.* Dysregulated Network of Immune, Endocrine and Metabolic Markers is Associated to More Severe Human Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Neuroimmunomodulation* 2018; 25: 119-128.
43. Mocelin AO, Issa VS, Bacal F, Guimarães GV, Cunha E, Bochi EA. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: A prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*, 2005; 7: 869-873.
44. Dutra WO, Menezes CAS, Magalhaes LMD, GOLLOB KJ Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite immunol*, 2014; 36: 377–387.
45. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC *et al.* Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Osw Cruz*, 2009: 104: 252-258.
46. Curvo EO, Ferreira RR, Madeira FS, *et al.* Correlation of transforming growth factor- β 1 and tumour necrosis factor levels with left ventricular function in Chagas disease. *Mem Ins Oswaldo Cruz*, 2018; 113: 1-8.

47. Ward LS, Guariento ME, Fernandes GA, Maciel RMB. Serum cytokines in chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bra Med Trop* 1999; 32: 285-289.
48. Miller MJ, Wrightsman RA, Manning JE. *Trypanosoma cruzi*: Protective Immunity in Mice Immunized with Paraflagellar Rod Proteins Is Associated with a T-Helper Type 1 Response. *Exp Parasitol*, 1996; 84: 156-167.
49. Pisseti CW, Correia D, Braga TT, *et al.* Association between the plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. *Rev Soc Bra Med Trop*, 2009; 42: 425-430.
50. Joyce DA, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M, Brennan FM. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2699-2705.
51. Lorena VMB, Verçosa AFA, Machado RCA, *et al.* Cellular Immune Response From Chagasic Patients to CRA or FRA Recombinant Antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clin Lab Ana*, 2008; 22: 91-98.
52. Pisseti CW, Correia D, Oliveira RFD, *et al.* Genetic and Functional Role of TNF-alpha in the Development *Trypanosoma cruzi* Infection. *Plos Negl Trop Dis* 2011; 5: e976.

ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO NO CEP



Título do Projeto: "Avaliação de marcadores imunológicos em portadores da cardiopatia da doença de Chagas utilizando os antígenos CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*."

Pesquisador responsável: Yara de Miranda Gomes

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 17/05/2010

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 33/10

Registro no CAAE: 0032.0.095.000-10

PARECER Nº 34/2010

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 07 de julho de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 07 de julho de 2010.

Giulie Campozano Gouveia



Giulie Campozano Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Méd. SIAPE 0463376
CPqAM / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 07/07/2011.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comiteeetica@cpqam.fiocruz.br

