

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

POLIMORFISMO DO GENE DE TGF-  $\beta$ 1 E A CORRELAÇÃO COM  
A SUSCEPTIBILIDADE E PROGRESSÃO DA DOENÇA DE  
CHAGAS

**ROBERTO RODRIGUES FERREIRA**

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F383 Ferreira, Roberto Rodrigues

Polimorfismo do gene de TGF-  $\beta$ 1 e a correlação com a susceptibilidade e progressão da doença de chagas / Roberto Rodrigues Ferreira. – Rio de Janeiro, 2014.

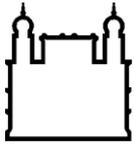
xv, 90 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 70-87

1. Doença de chagas. 2. Polimorfismo. 3. TGF –  $\beta$ 1. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

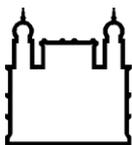
***ROBERTO RODRIGUES FERREIRA***

Polimorfismo do gene de TGF- $\beta$ 1 e a correlação com a susceptibilidade e progressão da doença de chagas

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular e Celular

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Mariana Caldas Waghabi

**RIO DE JANEIRO**  
Dezembro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTOR: ROBERTO RODRIGUES FERREIRA***

**POLIMORFISMO DO GENE DE TGF-  $\beta$ 1 E A CORRELAÇÃO COM A  
SUSCEPTIBILIDADE E PROGRESSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS**

**ORIENTADOR (ES): Dr<sup>a</sup>. MARIANA CALDAS WAGHABI**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Joseli Lannes Vieira – Presidente** (Laboratório de Biologia das Interações / IOC)

**Prof. Dr. Roberto Magalhães Saraiva** (Laboratório de Pesquisa Clínica em doença de Chagas / INI)

**Prof. Dr. Otacílio da Cruz Moreira** (Laboratório de Biologia Molecular de doenças endêmicas / IOC)

**Prof. Dr. Claudia Magalhães Calvet** (Laboratório de Ultraestrutura Celular / IOC)

**Prof. Dr. Gilberto Marcelo Sperandio** (Laboratório de doença de Chagas / INI)

Rio de Janeiro, 09 de dezembro de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Denise Ferreira e Carlos Roberto  
Ferreira, por sempre estarem ao meu  
lado me apoiando.

## **AGRADECIMENTOS**

A mim, Roberto Ferreira, por ter conseguido encontrar sabedoria, força e coragem para conseguir concluir mais esta importante etapa da minha vida profissional.

À minha família, porquê sem eles tenho total certeza que não teria conseguido chegar até aqui. Pai, Carlos Ferreira, obrigado por acreditar, me apoiar e investir em mim. Irmão, Diogo Ferreira, obrigado por me ajudar sempre quando eu preciso. Avó, Derdelina Pimentel, obrigado pela constante torcida, pelos inúmeros recortes de jornal com vagas em concurso (rsrsrs) e toda a confiança depositada em mim. Mãe, Denise Pimentel, obrigado somente por você existir. Não há agradecimento que justifique todo amor, amizade, cumplicidade, apoio, carinho, incentivo, ajuda, e tudo o que você fez, faz e SEMPRE fará por mim. Aquela frase clichê: “Eu tenho a melhor mãe do mundo” no seu caso é a mais pura verdade. Mas fica aqui registrado o meu eterno agradecimento a você.

Aos meus amigos, que foram fundamentais nos momentos de insegurança que por vezes passei. Representativamente, cito alguns: Lucas Brandão, obrigado por ser mais do que um simples amigo. Sempre presente, com sábias frases de conforto e ajuda, me fazendo mais confiante. Fernanda Chagas, obrigado por todos os momentos ao seu lado. Amizade de anos que há de permanecer para sempre.

À Dr<sup>a</sup> Mariana Waghbi, que também foi/é uma protagonista durante a minha formação acadêmica. Com todo o seu profissionalismo e sabedoria conseguiu me guiar durante esses anos, me tornando mais crítico, forte e confiante. Obrigado sempre pela paciência, incentivo, confiança... por tudo.

À Universidade Federal Fluminense, pelo ensinamento transmitido durante os anos da graduação, que me serviram de base para a compreensão e execução deste trabalho.

À Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Oswaldo Cruz, obrigado pela oportunidade de estudar, aprender e me especializar neste programa de referência que é a Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.

À Dra. Leila e ao Dr. Wim, obrigado pela oportunidade, em 2011, de fazer parte desse importante grupo de pesquisa e continuar no LAGFB até os dias atuais.

Ao Dr. Roberto pela criteriosa revisão realizada. Obrigado pela disponibilidade em nos ajudar sempre que precisamos.

Aos integrantes do LAGFB, sem exceção. Cada um de vocês tem sua participação neste trabalho. Mas preciso agradecer diretamente alguns amigos:

À Dra. Patrícia = saudade! Saudade da convivência diária, das manias esquisitas, das conversas, das expressões incontroláveis, dos desabafos, dos picolés à tarde. Saudade da amiga que conquistei e que continuará no laboratório sempre. Obrigado por todos esses anos de bancada juntos!

À Neiva e Sônia = amizade! Quando cheguei à Fiocruz elas foram as primeiras a me desejar boas-vindas. E quem diria que em pouco tempo já nos tornaríamos grandes amigos!? Dona Neiva e Dona Sônia, obrigado por tudo SEMPRE!

À Paloma = generosidade! Sempre disponível a me ajudar: seja pessoalmente, por e-mail ou até altas horas da madrugada por telefone. Obrigado pela amizade e companheirismo.

À Dra. Carolina = para sempre! obrigado por tudo, Carol.

À Dra. Ana = mãe! Está para nascer pessoa igual a você. Obrigado pelo ombro amigo de sempre.

À Aline = ajuda! Obrigado também pelo apoio com o sequenciamento.

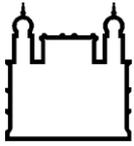
À Renata-Abajur = irmã! Pessoa incrível que a Fiocruz trouxe para a minha vida. Obrigado por me fazer gostar de uma criança antes mesmo dela nascer. Obrigado também pelas ajudas, que não foram poucas, durante esses 2 anos de mestrado.

À Müller = sem definição! Chegou repentinamente: em um domingo a vi por Copacabana e na segunda já era técnica da plataforma de sequenciamento. Obrigado pelos eternos momentos de felicidade compartilhados! Você foi a grata surpresa de 2013.

À Rayane = aprendizagem! Obrigado por ter me dado a oportunidade de viver esta diferente tarefa que é “orientar”. Obrigado também pela confiança.

À FIOCRUZ, ao IOC, ao LAGFB, ao Inserm, ao CNPq/Decit, à FAPERJ e à CAPES pelo apoio financeiro. Obrigado! Porque essa ajuda possibilitou a manutenção e execução de todos os experimentos realizados.

Obrigado a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.



Ministério da Saúde

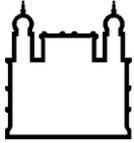
**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## POLIMORFISMO DO GENE DE TGF- $\beta$ 1 E A CORRELAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE E PROGRESSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS

### RESUMO

Estudos desenvolvidos pelo grupo nos últimos anos demonstram o envolvimento do fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) na cardiopatia chagásica, com exacerbação dos seus níveis plasmáticos e da ativação da sua via de sinalização celular como aspectos desenvolvidos por pacientes nos estágios mais avançados da doença, associado também a níveis elevados de fibrose. Pacientes que apresentavam altos níveis de TGF- $\beta$  circulantes, após 10 anos de acompanhamento, evoluíram com pior prognóstico da doença. Recentemente, o polimorfismo no códon 10 do gene que codifica o TGF- $\beta$ 1 foi descrito por influenciar na produção desta citocina. Também foi observado que, em populações da Colômbia e do Peru, o mesmo polimorfismo pode estar envolvido na susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*. O presente trabalho avaliou o polimorfismo dos alelos do gene do TGF- $\beta$ 1 em pacientes na fase crônica da doença de Chagas; incluindo a forma indeterminada e os diversos estágios da forma cardíaca e correlacionou a expressão dos diferentes alelos do TGF- $\beta$ 1 com os níveis séricos desta citocina e a manifestação clínica da doença de Chagas. Para isso, 181 indivíduos entre pacientes com forma indeterminada ou cardíaca e indivíduos controle foram convidados a participar do trabalho. Foram realizadas análises de cinco polimorfismos de base única (-800 G>A, -509C>T, +10T>C, +25G>C e +263C>T) por PCR e sequenciamento das regiões de interesse. Além disso, os níveis séricos desta molécula e do peptídeo natriurético cerebral (BNP) foram dosados por ELISA. Ao analisar a frequência genotípica nos diferentes polimorfismos, observamos que a frequência do polimorfismo na posição -509 e no códon 10 eram maiores em pacientes portadores da doença que em indivíduos controle. Além disso, os genótipos CT e TT na posição -509 estão associados com altos níveis séricos do TGF- $\beta$ 1. Observamos que pacientes nos estágios mais graves apresentam maiores níveis circulantes de BNP, mas, não observamos qualquer relação entre os níveis de TGF- $\beta$  e BNP. Desta forma, nossos resultados sugerem que os polimorfismos genéticos na posição -509 e no códon 10 do gene TGF- $\beta$ 1 podem estar envolvidos na susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* na doença de Chagas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### TGF- $\beta$ 1 GENE POLYMORPHISMS AND CHAGAS DISEASE SUSCEPTIBILITY AND PROGRESSION

#### ABSTRACT

Studies developed by our group have shown the involvement of TGF- $\beta$  in Chagas heart disease, with exacerbation of their plasma levels and the activation of its cell signaling pathway, as aspects developed by patients in later stages of the disease, also associated with high levels of fibrosis. Patients with higher levels of circulating TGF- $\beta$ , after 10 years of follow up, progressed with worse prognosis. Recently, the polymorphism at codon 10 in the TGF- $\beta$ 1 gene has been described to influence the production of this cytokine. It was also noted that in populations from Colombia and Peru, the same polymorphism may be involved in susceptibility to *T. cruzi* infection. The present study assessed the polymorphism of the alleles of the TGF- $\beta$ 1 gene in patients with chronic Chagas disease: indeterminate and the different stages of cardiac forms, correlating the expression of different alleles of TGF- $\beta$ 1, serum levels of this cytokines and the clinical outcome of Chagas disease. For this, 181 control and patients of different stages in the chronic phase of Chagas disease were invited to participate in the study. We investigated, five single nucleotide polymorphisms (-800 G> A, -509C> T + 10T> C + 25G> C and + 263C> T) by PCR and sequencing of fragments were performed. In addition, serum levels of TGF- $\beta$ 1 and BNP were measured by ELISA. We observed a significant difference in the frequency at positions -509 and codon 10. These genotypes represent a risk for susceptibility to the development of Chagas disease. Furthermore, CT and TT genotypes at position -509 are associated with higher serum levels of TGF- $\beta$ 1. We found a significant association between circulating levels of BNP with the stage of CCC, but, no relationship between the levels of TGF- $\beta$  and BNP was observed. Thus, our results suggest that genetic polymorphisms at position -509 and codon 10 of the TGF- $\beta$ 1 gene may be involved in the susceptibility to the development of Chagas disease.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 A doença de Chagas</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 A descoberta .....	1
1.1.1 Epidemiologia .....	1
<b>1.2 O parasito: <i>T. cruzi</i></b> .....	<b>3</b>
1.2.1 Formas evolutivas e Ciclo de vida .....	4
<b>1.3 Fases da doença</b> .....	<b>7</b>
1.3.1 Fase aguda .....	7
1.2.1 Fase crônica .....	7
<b>1.4 Tratamentos etiológicos disponíveis</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5 A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC)</b> .....	<b>9</b>
1.5.1 Fibrose.....	10
<b>1.6 O Fator Transformador de Crescimento Beta (TGF-<math>\beta</math>)</b> .....	<b>11</b>
<b>1.7 Envolvimento de citocinas na doença de Chagas</b> .....	<b>13</b>
1.7.1 TGF- $\beta$ e infecção experimental: <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	14
1.7.2 TGF- $\beta$ e a doença de Chagas .....	16
<b>1.8 O gene: TGF-<math>\beta</math>1</b> .....	<b>17</b>
1.8.1 Principais SNP no gene TGF- $\beta$ .....	18
1.8.1.1 Região promotora: -800G>A.....	18
1.8.1.2 Região promotora: -509C>T .....	19
1.8.1.3 Exon 1: Códon 10T>C .....	19
1.8.1.4 Exon 1: Códon 25G>C.....	20
1.8.1.5 Exon 5: +263C>T.....	20
<b>1.9 Polimorfismo no gene de TGF-<math>\beta</math> e a doença de Chagas</b> .....	<b>21</b>
<b>1.10 Justificativa</b> .....	<b>21</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>22</b>

<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.1	Desenho experimental .....	23
3.2	Considerações éticas.....	23
3.3	Crítérios de inclusão e exclusão.....	23
3.4	Recrutamento dos pacientes.....	24
3.5	População do estudo .....	24
3.6	Coleta e processamento do material biológico .....	25
3.6.1	Coleta do sangue .....	25
3.6.2	Extração do DNA genômico .....	26
3.6.3	Obtenção do soro .....	26
3.7	Genotipagem.....	26
3.7.1	SNP do gene de TGF- $\beta$ 1 .....	26
3.7.2	Desenho dos oligonucleotídeos.....	27
3.7.3	PCR convencional .....	28
3.7.4	Purificação dos produtos amplificados e Sequenciamento .....	28
3.8	Quantificação dos níveis séricos TGF- $\beta$ e BNP .....	28
3.9	Análise estatística .....	29
3.9.1	Cálculo do tamanho amostral .....	29
3.9.2	Frequências alélicas e genotípicas.....	29
3.9.3	Diferenças entre os parâmetros quantitativos .....	29
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
4.1	Descrição da população do estudo .....	30
4.1.1	Pacientes.....	30
4.1.2	Características eletrocardiográficas e ecocardiográficas .....	32
4.2	Avaliação dos polimorfismos.....	36
4.2.1	Região promotora do gene TGF- $\beta$ 1: -800G>A .....	37
4.2.2	Região promotora do gene TGF- $\beta$ 1: -509C>T.....	38
4.2.3	Exon 01 do gene TGF- $\beta$ 1: +10T>C .....	40
4.2.4	Exon 01 do gene TGF- $\beta$ 1: +25G>C.....	42
4.2.5	Exon 01 do gene TGF- $\beta$ 1: +263C>T .....	44
4.3	Níveis de proteínas circulantes.....	45
4.3.2	TGF- $\beta$ e BNP .....	45
4.4	Análise dos polimorfismos com os níveis séricos de TGF- $\beta$ .....	47

4.5	Avaliação dos polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com os níveis séricos de BNP .....	50
4.6	Avaliação dos polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com a fração de ejeção ventricular .....	50
4.7	Avaliação da fração de ejeção ventricular com os níveis de TGF- $\beta$ 1 e BNP .....	53
5	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
6	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>
8	<b>ANEXO</b>	<b>88</b>
8.1	Parecer comitê de Ética .....	88
4.4	Termo de consentimento .....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Distribuição da doença de Chagas .....	2
Figura 1.2: Distribuição global de indivíduos infectados pelo <i>T. cruzi</i> .....	3
Figura 1.3: O ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	6
Figura 1.4: TGF- $\beta$ associado ao LAP.....	12
Figura 1.5: Esquema mostrando as regiões do cromossomo 19 .....	18
Figura 3.1: Fluxograma .....	25
Figura 4.1: Informações obtidas durante a consulta médica.....	31
Figura 4.3: Análise dos níveis séricos do TGF- $\beta$ .....	46
Figura 4.4: Análise dos níveis séricos do BNP .....	48
Figura 4.5: Associação dos polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com os níveis séricos do TGF- $\beta$ 1 .....	49
Figura 4.6: Associação dos polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com os níveis séricos do BNP: .....	51
Figura 4.7: Associação dos polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com a fração de ejeção ventricular .....	52
Figura 4.8: Análise comparativa dos níveis circulantes de TGF- $\beta$ 1 e BNP .....	53
Figura 5.1: Esquema do possível mecanismo envolvendo o polimorfismo na posição -509.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Características gerais dos SNP .....	27
Tabela 3.2 Cartacterísticas gerais dos pares de oligonucleotídeos.....	27
Tabela 4.1 Características clínicas dos indivíduos analisados .....	33
Tabela 4.2 Características eletrocardiográficas dos indivíduos participantes do estudo .....	34
Tabela 4.3 Características ecocardiográficas dos indivíduos participantes do estudo .....	36
Tabela 4.4 Polimorfismo na posição -800 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a doença .....	37
Tabela 4.5 Polimorfismo na posição -800 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a progressão .....	38
Tabela 4.6 Polimorfismo na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a doença .....	39
Tabela 4.7 Polimorfismo na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a progressão .....	40
Tabela 4.8 Polimorfismo codón 10 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a doença .....	41
Tabela 4.9 Polimorfismo codón 25 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a progressão .....	42
Tabela 4.10 Polimorfismo codón 25 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a doença .....	43
Tabela 4.11 Polimorfismo codón 10 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a progressão .....	43
Tabela 4.12 Polimorfismo posição +263 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação .....	44
Tabela 4.13 Polimorfismo posição +263 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a progressão .....	45

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- °C – grau Celsius
- A – velocidade máxima do fluxo mitral na contração atrial
- AE – átrio esquerdo
- APRV – alteração primária da repolarização ventricular
- BNP – peptídeo natriurético cerebral
- BRD – bloqueio completo de ramo direito
- BV – baixa voltagem
- BZ – benznidazol
- C – citosina
- CCC – cardiomiopatia chagásica crônica
- cm – centímetro
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- E – velocidade máxima do fluxo mitral na fase de enchimento rápido
- E' – velocidade máxima do deslocamento miocárdio no início da diástole
- ECG – eletrocardiograma
- ECO – ecocardiograma
- ERK – quinases ativadas por mitógenos
- FE – fração de ejeção
- g – aceleração da gravidade
- G – guanina
- h – hora
- HBAE – hemibloqueio anterior esquerdo
- IFN- $\gamma$  – interferon gama
- IL-1 – interleucina 1
- IL-4 – interleucina 4
- INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- JNK – C-Jun N-terminal quinase
- kDa – quilodalton
- LAGB – Laboratório de Genômica funcional e Bioinformática
- mL – mililitro
- mM – milimolar
- MP – marcapasso

OMS – Organização Mundial de Saúde  
p38 – proteínas quinases ativadas por mitógeno  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
PSAP – pressão sistólica de artéria pulmonar  
RNA – ácido ribonucleico  
rpm – rotações por minuto  
SNP – polimorfismo de nucleotídeo único  
T – timina  
TD – tempo de desaceleração da onda E  
TGF- $\beta$  – fator de transformador de crescimento beta  
TNF – fator de necrose tumoral  
T $\beta$ RI – receptor de TGF- $\beta$  do tipo I  
T $\beta$ RII – receptor de TGF- $\beta$  do tipo II  
T $\beta$ RIII – receptor de TGF- $\beta$  do tipo III  
V – volume  
VE<sub>d</sub> – diâmetro do ventrículo esquerdo no final da diástole  
VE<sub>s</sub> – diâmetro do ventrículo esquerdo no final da sístole.  
ZEI – zona elétrica inativa.  
 $\mu$ g – micrograma  
 $\mu$ L – microlitro

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A doença de Chagas

### 1.1.1. A descoberta

Em 1907, encarregado de executar uma campanha anti-palúdica na região norte do estado de Minas Gerais, o pesquisador Carlos Chagas observou a existência de um hematófago nas habitações visitadas. Retornando ao laboratório e analisando o intestino dos exemplares coletados, Carlos Chagas identificou a presença de numerosos flagelados, hoje classificados como *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Nesse período, Carlos Chagas caracterizou o agente causador e o ciclo biológico da tripanossomíase americana, assim como os principais sintomas clínicos associados a esta doença (Chagas, 1909). Em 1910, em homenagem ao pesquisador, a infecção foi então intitulada como “doença de Chagas”. (Livro: Carlos Chagas, A ciência para combater doenças tropicais).

### 1.1.2. Epidemiologia

A doença de Chagas é uma doença negligenciada causada pelo protozoário parasita *T. cruzi*, sendo considerada endêmica de 21 países da América Latina (Figura 1.1). A principal forma de transmissão da doença de Chagas aos seres humanos se dá pelo contato com as fezes dos vetores, os triatomíneos. Estima-se que cerca de 7-8 milhões de pessoas possam estar infectadas em todo o mundo (OMS, 2014), e que mais de 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de contaminação. Só em 2008, pesquisas avaliaram que a doença de Chagas ocasionou a morte de aproximadamente 10 mil pessoas em todo o mundo (OMS, 2012). Já no Brasil, em 2012, dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade do Ministério da Saúde indicam mortalidade de 4.650 indivíduos portadores da doença de Chagas (DATASUS, 2012). Mesmo com mais de um século após a sua descoberta, a doença de

Chagas ainda é um grande problema econômico e de saúde pública na maioria dos países latino-americanos (Rassi Jr. e cols., 2009). Atualmente, o valor líquido global utilizado com cuidados médicos para indivíduos portadores da doença de Chagas é de 24-73 bilhões de dólares. A conversão desse encargo sobre o valor disponibilizado por pessoa resulta em gasto anual de \$4660, e ao longo da vida um indivíduo é capaz de gerar \$27684 em gastos para os cofres públicos (Lee e cols., 2013).

Apesar de ser considerada uma doença com distribuição geográfica limitada, se estendendo do Sul dos Estados Unidos até o Sul da Argentina e Chile. Desde os anos 80 há uma preocupação mundial com os processos de migração populacional associados à doença de Chagas, já que os imigrantes podem ser fonte de introdução da doença em países não-endêmicos. Transfusão de sangue, doação de órgãos e infecção congênita são os modos primários de infecção nos países de destino dos imigrantes infectados pelo *T. cruzi* (Revisto por Schmunis e Yadon, 2010). Sendo assim, atualmente podemos observar um grande número de casos da doença em países não-endêmicos, como a Austrália, Canadá e Espanha (Schmunis, 2007) (Figura 1.2).



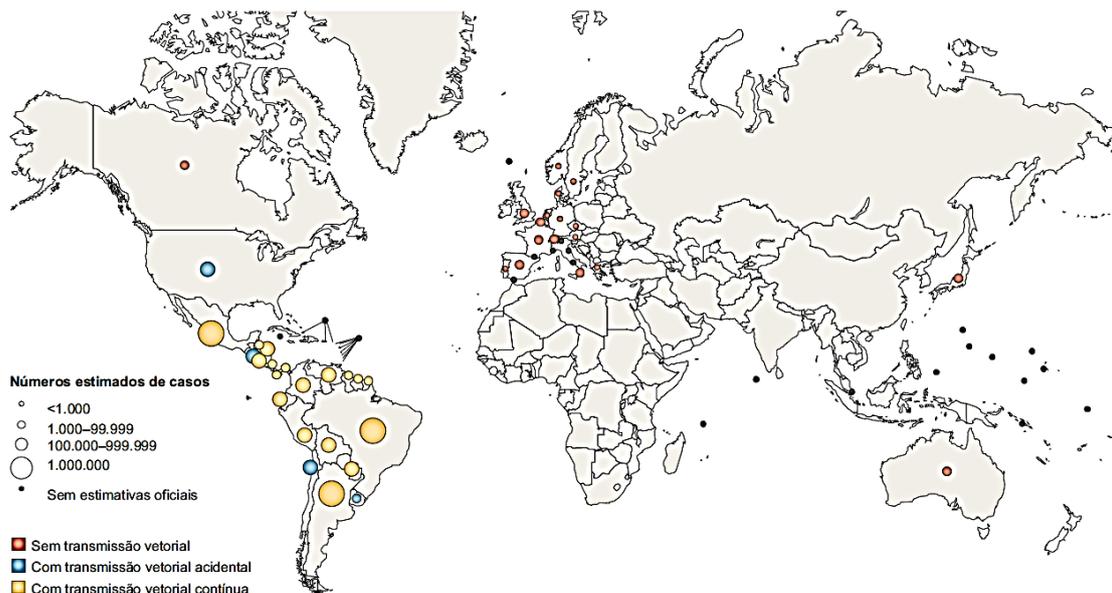


Figura 1.2: Distribuição global de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, evidenciando a existência de casos da doença em países não-endêmicos (adaptado de Ribeiro e cols., 2012).

## 1.2. O parasito: *T. cruzi*

O *T. cruzi*, agente etiológico causador da doença de Chagas, é um protozoário digenético e polifilético pertencente ao Filo Protozoa, Subfilo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Tripanosomatidae. É amplamente distribuído na natureza e tem como circulação primária os insetos vetores (Triatominae, Hemiptera, Reduviidae) (Dias, 2006) e mamíferos silvestres e domésticos pertencente às ordens, Edentata, Chiroptera, Marsupialia, Carnivora, Lagomorpha, Rodentia e Primates (OMS, 2002). Estima-se que este parasita exista há mais de 150 milhões de anos no planeta. Por possuir grande diversidade genética, os clones e populações de *T. cruzi* têm sido agrupados, mediante a estudos de perfil molecular e isoenzimático, em seis grandes linhagens denominados TcI a TcVI (revisito por Zingales e cols., 2012). Recentemente, foi identificado um novo genótipo associado a morcegos das espécies: *Noctilio* spp., *Myotis* spp. e *Artibeus* spp. nomeadas

como TcBat. Mas o papel do TcBat em infecções humanas não é claro (revisto por Ramírez, 2014).

### 1.2.1. Formas evolutivas e Ciclo de vida

Desde a descrição inicial por Carlos Chagas, a morfologia dos vários estágios do desenvolvimento do *T. cruzi* tem sido alvo de intensa investigação (de Souza, 2002; Elias e cols., 2006; Zacks e cols., 2007; Romano e cols., 2012). O *T. cruzi* foi uma das primeiras células a ser analisada por microscopia eletrônica de transmissão e vários grupos de pesquisa têm utilizado diferentes técnicas microscópicas para obter informações detalhadas sobre os vários estágios de desenvolvimento encontrados no ciclo de vida do parasita intracelular (revisto por de Souza e cols., 2009). Estes estágios são conhecidos como: amastigota, epimastigota e tripomastigota (metacíclico e sanguíneo). As duas primeiras formas são capazes de se dividir, e as formas tripomastigotas e amastigotas são capazes de infectar as células dos hospedeiros (Marin-Neto e cols., 2009).

Entre os tripanosomatídeos, o *T. cruzi* é o que apresenta um dos ciclos de vida mais complexos, envolvendo diversos estágios de desenvolvimento: sendo encontrados em hospedeiros vertebrados e invertebrados, na corrente sanguínea e no interior de células hospedeiras (de Souza e cols., 2010). A Figura 1.3 mostra uma visão geral do ciclo de vida deste protozoário. O inseto triatomíneo ao sugar o sangue de um vertebrado com doença de Chagas, se infecta ingerindo as formas tripomastigotas sanguíneas (formas infectantes do parasita). Uma vez dentro do vetor, na porção média do intestino do barbeiro, o parasita se diferencia em formas epimastigotas e se multiplicam ativamente por divisão binária longitudinal. Antes de emergir às fezes, na porção distal do intestino do inseto, o parasita se diferencia na forma infectante tripomastigota metacíclica. Durante este processo de diferenciação (chamado de metaciclogênese), o parasita sofre modificações morfológicas e bioquímicas complexas que lhe permitem sobreviver no hospedeiro vertebrado (Dias e cols., 2006; Clayton e cols., 2010; Osorio e cols., 2012).

Quando o triatomíneo se alimenta novamente, ele defeca sobre a pele do indivíduo, depositando as formas infectantes do *T. cruzi*. O parasita é capaz de penetrar no novo hospedeiro através de lesões, pela conjuntiva dos olhos e mucosa da boca. Desta forma, ele toma a corrente sanguínea podendo infectar todas as células dos mamíferos, principalmente os macrófagos (Teixeira e cols., 2012). No interior da célula do hospedeiro as formas tripomastigotas metacíclicas se diferenciam em formas arredondadas, as amastigotas, que se submetem a ciclos de multiplicação por fissão binária. Este processo, em média, tem duração de 96 horas. Após este período, há a diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas sanguíneas. Frente ao grande número e à intensa movimentação destas últimas formas, há a ruptura da membrana plasmática da célula hospedeira e consequente liberação dos parasitos para o ambiente extracelular. Assim, as formas tripomastigotas liberadas podem infectar outras células ou atingir a corrente sanguínea, infectando outros tecidos ou então ser ingeridas pelo inseto vetor, mantendo assim o ciclo da doença de Chagas (Teixeira e cols., 2006).

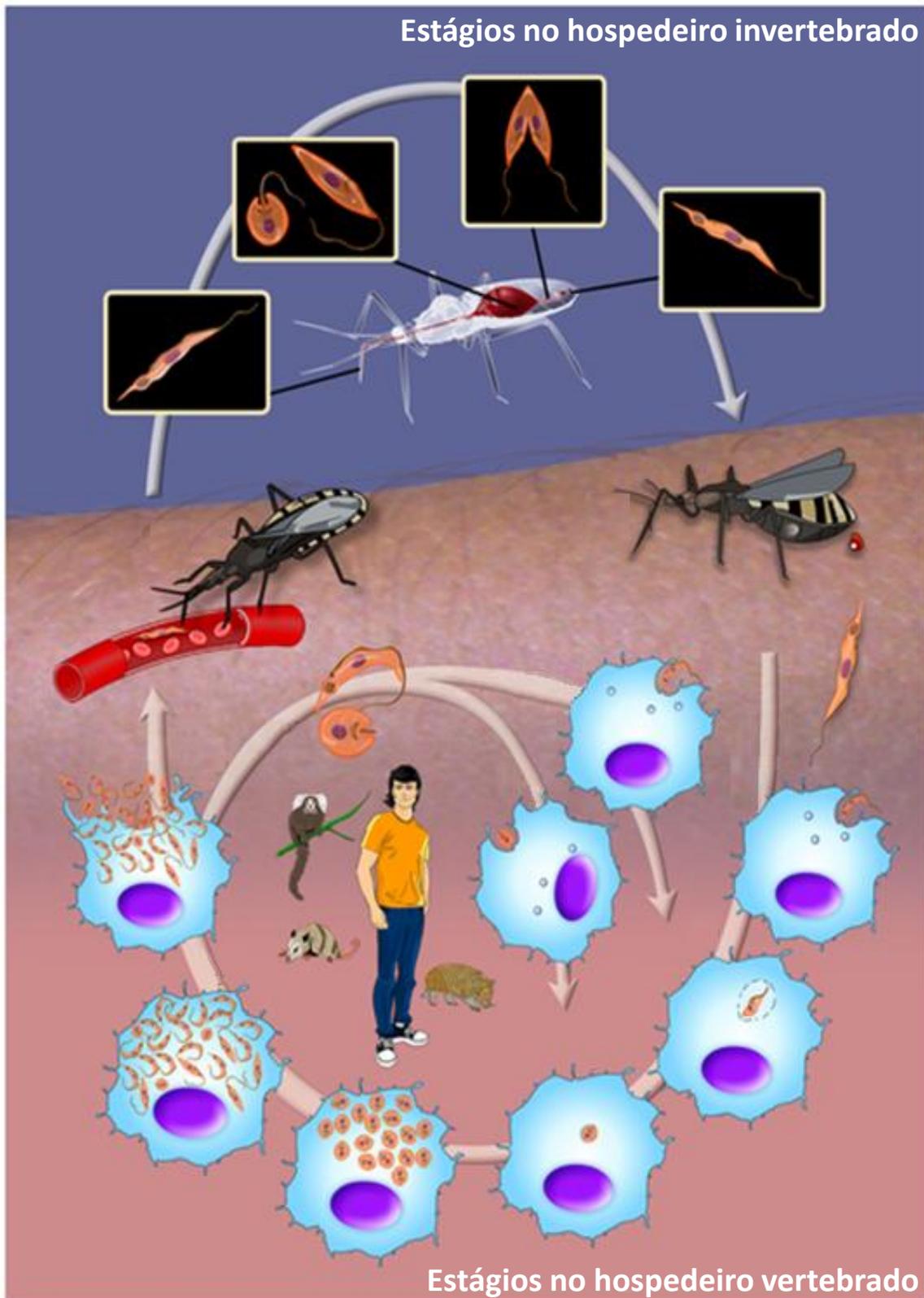


Figura 1.3: O ciclo de vida do *T. cruzi* evidenciando suas formas evolutivas (epimastigota, tripomastigota e amastigota) e principais hospedeiros e reservatórios. (adaptado de Teixeira e cols., 2012).

### 1.3. Fases da Doença

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases distintas: a fase aguda e a fase crônica (Prata, 2001).

#### 1.3.1. Fase Aguda

A fase aguda tem duração média de 1-2 meses, sendo geralmente assintomática ou se manifesta pela presença de sintomas comuns a outras doenças, como febre e dores no corpo (Rassi Jr e cols., 2009). Uma das características principais da fase aguda é a alta carga parasitária na corrente sanguínea do indivíduo infectado (Chagas, 1909). Em alguns casos, observa-se a presença de edemas no local da porta de entrada do *T. cruzi*, o chagoma de inoculação e o sinal de Romana. Não é comum a manifestação da doença de Chagas aguda grave, mas em casos de pacientes sintomáticos nesta fase, as manifestações incluem adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia e miocardite. Contudo, sintomas ainda mais graves como a mortalidade por encefalomielite, insuficiência cardíaca grave ou ramo do pericárdico podem ocorrer, mas representam 5% dos casos, nos quais a maioria dos indivíduos infectados são crianças de regiões endêmicas (revisto por Ribeiro e cols., 2012). Há também a fase aguda desenvolvida por indivíduos infectados pela via oral, que tem sido considerada uma importante via de transmissão e possui uma variedade de sintomas. A infecção pelo *T. cruzi* por via oral está associada a alta mortalidade, 8-35% dos casos, podendo estar relacionada com insuficiência cardíaca aguda, miocardite, e meningoencefalite (Coura e cols., 2002). Além disso, estudos demonstraram uma grave inflamação na mucosa gástrica e no mesentério adjacente após 14 dias de infecção (Hoft e cols., 1996).

#### 1.3.2. Fase Crônica

Após a fase aguda, a doença de Chagas não tratada evolui para fase crônica, que possui duas formas: indeterminada e determinada. Na forma

indeterminada, os indivíduos apresentam sorologia positiva e não são observados sintomas ou sinais clínicos de acometimento de órgãos-alvo da doença de Chagas comprovados por exames complementares (Marin-Neto e cols., 2002). Após um período de tempo (10-30 anos), cerca de 30% dos pacientes evoluem para a forma determinada da doença de Chagas, que compreende as formas cardíacas, digestiva e mista (Coura, 2007).

#### **1.4. Tratamentos etiológicos disponíveis**

Na doença de Chagas aguda o tratamento é tripanossomicida. O tratamento reduz a gravidade, a duração dos sintomas e também a mortalidade dos indivíduos infectados. A taxa de cura é de até 81% dos casos. Apenas duas drogas, benznidazol (BZ) e nifurtimox, são mundialmente recomendadas para o tratamento da doença de Chagas. O BZ tem sido mais analisado em estudos clínicos e tem melhores resultados quanto à segurança e eficácia, portanto é geralmente utilizado para o tratamento de primeira linha. O efeito adverso mais comum do BZ é dermatite alérgica que afeta cerca de 20-30% dos pacientes. Outro efeito adverso, que ocorre em cerca de 5-10% dos pacientes é neuropatia periférica dose-dependente, que afeta principalmente as partes distais dos membros inferiores. Outros efeitos colaterais relatados incluem náuseas, vômitos, anorexia, perda de peso, insônia e perda do paladar. O efeito do BZ na fase crônica da doença de Chagas está sendo avaliado em um estudo clínico randomizado chamado BENEFIT, envolvendo diversos centros de pesquisa (revisto por Rassi Jr. e cols., 2012).

Já o nifurtimox, está associado a vários efeitos adversos, que geralmente desaparecem quando o tratamento é interrompido. Os sintomas gastrointestinais são os efeitos colaterais mais comuns relatados em estudos clínicos, ocorrendo em cerca de 50% dos pacientes, e incluem anorexia, náuseas, vômitos, desconforto abdominal e diarreia. Outros efeitos colaterais comuns são os sintomas de toxicidade do sistema nervoso central, tais como insônia, irritabilidade, desorientação, dores de cabeça, mialgia, tontura e alterações de humor (revisto por Rassi Jr. e cols., 2012). Tais efeitos adversos

observados em ambos tipos de tratamento incentivaram pesquisas mundiais no intuito de se obter um composto alternativo menos nocivo.

### **1.5. A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC)**

A forma cardíaca é a manifestação mais grave da doença de Chagas crônica, devido à sua alta morbidade, mortalidade e seu significativo impacto médico e social (Parra e cols., 2008; Henao-Martínez e cols., 2012). A CCC também é a causa mais comum de cardiomiopatia na América Latina e em áreas endêmicas é a principal causa de morte cardiovascular em pacientes com idade de 30-50 anos (Rassi e cols., 2000). As alterações encontradas no eletrocardiograma (ECG) e/ou ecocardiograma (ECO) são os primeiros indícios do desenvolvimento de CCC (Dubner e cols., 2008).

Algumas hipóteses para a fisiopatogenia têm sido implicadas ao dano miocárdico, variando desde a disautonomia simpática e parassimpática, alterações microvasculares coronarianas, processos autoimunes até a agressão direta pelo parasita (Pereira Jr. e cols., 2014). Durante a CCC, o parasita permanece no interior das células cardíacas do hospedeiro, causando danos teciduais, envolvendo processos inflamatórios extensos e fibrose irregular (Higuchi e cols., 1993). A inflamação e a destruição progressiva do tecido cardíaco, seguida de intensa fibrose levam a alteração da condução dos impulsos elétricos no coração, arritmias, dilatação e disfunção sistólica. Fenômenos tromboembólicos também podem ocorrer. O tratamento utilizado nesta fase é apenas sintomático e a possibilidade de realização de transplantes cardíacos é bem menor do que a demanda. Dessa forma, a CCC pode ter curso fatal levando o paciente à morte súbita. (Teixeira e cols., 1990; Rassi Jr, e cols., 2009).

Sendo assim, alguns estágios são observados na CCC. De acordo com o Consenso Brasileiro para doença de Chagas (2005), a fase crônica cardíaca é classificada da seguinte forma: estágio A, os pacientes apresentam eletrocardiograma (ECG) alterado e ecocardiograma (ECO) normal; estágio B,

os pacientes possuem ECO com alteração global ou segmentar da função sistólica do ventrículo esquerdo sem clínica de insuficiência cardíaca (IC), subdivido em B1: com fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo (VE)  $\geq$  45% e B2: FE  $\leq$  45%; estágio C, os pacientes apresentam IC não refratária; e estágio D, os pacientes possuem IC refratária.

Apesar destas definições, o quadro clínico varia muito de acordo com a duração da doença e a extensão do dano cardíaco. Manifestações precoces da CCC são geralmente leves, muitas vezes caracterizada pela presença de anormalidades assintomáticas no ECG ou em outros exames complementares, como por exemplo: monitoramento com Holter por 24 horas, ressonância magnética ou ECO. Este último é extremamente útil na avaliação de pacientes com CCC. A técnica é utilizada principalmente para avaliar a função ventricular, que fornece dados importantes para a orientação terapêutica e prognóstico (revisto por Ribeiro e cols., 2012).

Análises laboratoriais também auxiliam na identificação dos pacientes que poderão evoluir para um pior prognóstico. A dosagem do peptídeo natriurético cerebral (BNP), ao lado dos dados clínicos, tem se mostrado útil na avaliação prognóstica. Quanto mais elevados os níveis do peptídeo, pior será o quadro e evolução do paciente, uma vez que os níveis de BNP sofrem influência direta da situação funcional cardíaca dos pacientes (revisto por Pereira-Barretto e cols., 2013).

### **1.5.1. Fibrose**

O achado histopatológico mais importante na CCC é a fibrose, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (revisto por Rossi, 1998). Este é um processo onde há substituição do tecido danificado, frente à resposta inflamatória, por tecido conjuntivo que leva ao comprometimento funcional do órgão (Pohlers e cols., 2009). Uma variedade de modificações estruturais no sistema cardiovascular tem sido descrita em pacientes com CCC (Andrade, 1999). Mas a principal alteração ocorre no processo reparativo e fibrótico, no

qual há acúmulo difuso e denso de colágeno intersticial que envolve fibras individuais ou até mesmo um grupo inteiro de fibras (Rossi e cols., 1991).

O processo fibrótico, encontrado na CCC, é caracterizado pela formação de cicatriz excessiva devido à exacerbada produção e deposição de matriz extracelular. Este processo ocorre ao longo de muitos meses ou anos e pode conduzir à disfunção de órgãos ou até mesmo a morte do indivíduo (Pohlers e cols., 2009). Algumas moléculas participam na formação de processos fibrinogênicos, mas uma em especial desempenha papel fundamental neste processo induzindo a síntese de componentes de matriz extracelular. Essa molécula é o fator transformador de crescimento beta (revisto por Leask e Abraham, 2004).

### **1.6. O Fator Transformador de Crescimento Beta (TGF- $\beta$ )**

Em 1981, Roberts e cols. identificaram pela primeira vez um fator de crescimento que induzia fenótipo proliferativo em fibroblastos nos rins de ratos. Atualmente, sabe-se que o TGF- $\beta$  é uma proteína homodimérica que faz parte da superfamília TGF- $\beta$ . O TGF- $\beta$  é encontrado na maioria dos organismos eucarióticos, incluindo *C. elegans*, *Drosophila*, *Xenopus*, ratos e seres humanos. É expresso em praticamente todos os tipos de células, em quase todas as fases de desenvolvimento. O TGF- $\beta$  desempenha papel importante na regulação de várias respostas biológicas e celulares, incluindo a proliferação e diferenciação celular, produção da matriz extracelular, desenvolvimento embrionário, crescimento de células epiteliais, carcinogênese e apoptose (Boesen e cols., 2002; Kamato e cols., 2013).

Em células de mamíferos, há três subtipos de TGF- $\beta$ : 1, 2 e 3. Estas isoformas são bem caracterizadas como pequenas proteínas secretadas (25 kDa), homodiméricas (revisto por Massague, 1998), que são codificadas por genes distintos que estão localizados em diferentes cromossomos. Estas moléculas possuem homologia de 80% e são quase 100% conservadas entre as espécies. *In vitro*, os subtipos mostram funções muito semelhantes. Mas,

estudos *in vivo* têm demonstrado que estas moléculas são expressas de forma diferenciada ao longo da embriogênese, na reparação de tecidos e na carcinogênese, sugerindo diferentes funções para essas isoformas. Apesar disto, as isoformas do TGF- $\beta$  utilizam a mesma via de sinalização intracelular (Kim e cols., 2005; Golg e cols., 2000).

Devido à sua ampla função biológica o TGF- $\beta$  está sob rigoroso controle. Ele é sintetizado e secretado como um complexo de proteínas biologicamente inativo, sendo então considerado como proteína percursora dimérica, por estar associado ao LAP (proteína associada à latência) (Figura 1.4). Esta proforma é clivada na região amino-terminal em um pró-peptídeo e um fragmento carboxi-terminal, que constitui o TGF- $\beta$  maduro (Saharinen e cols., 1996; Massague e Chen, 2000a). Para desempenhar suas atividades biológicas, o TGF- $\beta$  depende da sua interação com os receptores de superfície do tipo I (T $\beta$ RI), do tipo II (T $\beta$ RII) e do tipo III (T $\beta$ RIII), já identificados em praticamente todos os tipos celulares (Massague e Gomis, 2006).

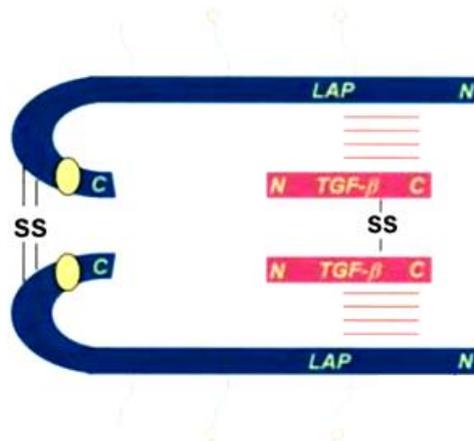


Figura 1.4: Proposta para o modelo do TGF- $\beta$  associado ao LAP (adaptado de Brunner e Blakytny, 2004).

Uma vez ativado e reconhecido pelos seus receptores de superfície, ocorre a ativação da via de sinalização do TGF- $\beta$ . Já foram descritos na literatura dois tipos de via: a via clássica (através da fosforilação de proteínas SMADs) e a via alternativa (através da fosforilação de outras proteínas, tais como: proteínas quinases ativadas por mitógenos (ERK), C-Jun N-terminal quinase (JNK), proteínas quinases ativadas por mitógeno p38) (Massague e

Wotton, 2000b; Massague e Gomis, 2006). Este processo resulta no recrutamento de cofatores ou corepressores transcricionais que levam a ativação ou repressão da transcrição dos genes responsivos ao TGF- $\beta$  (Shi e Massague, 2003).

### **1.7. Envolvimento de citocinas na doença de Chagas**

Os mecanismos que direcionam o desenvolvimento da doença de Chagas ainda não são totalmente compreendidos, mas há um consenso sobre o importante papel do sistema imune do hospedeiro. Sendo assim, as citocinas possuem papel fundamental nesse processo, já que estão envolvidas na regulação hematopoiética, linfopoiética e atividade de todos os tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória (Higuchi e cols., 1997).

Algumas moléculas possuem grande importância no desenvolvimento da doença de Chagas, por exemplo: o fator de necrose tumoral (TNF), o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e o TGF- $\beta$ . Estudos desenvolvidos com o TNF têm sugerido a sua participação no desenvolvimento de danos no tecido cardíaco do hospedeiro, já que o TNF participa de mecanismos citotóxicos durante a resposta inflamatória na infecção pelo *T. cruzi* (Pereira e cols., 2014). O TNF também tem participação na modulação da expressão de moléculas de adesão que auxiliam no recrutamento de linfócitos para os locais de inflamação, contribuindo para a progressão da resposta inflamatória na cardiopatia chagásica (revisto por Laucella e cols., 1996). Já o IFN- $\gamma$  é descrito como uma linfocina protetora ativando macrófagos. Este processo resulta na liberação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, conferindo ao IFN- $\gamma$  uma característica tripanossomicida (Golden e Tarleton, 1991).

Em relação ao TGF- $\beta$ , trabalhos têm demonstrado a participação desta molécula em alguns processos durante as fases aguda e crônica da doença, tais como: na invasão do *T. cruzi* nos fibroblastos e cardiomiócitos, no ciclo intracelular do parasita, na regulação da inflamação e da resposta imune, no

desenvolvimento da fibrose e remodelamento do tecido cardíaco (Araújo-Jorge e cols., 2008 e 2012). Desta forma, o TGF- $\beta$  medeia processos diferentes que influenciam no desenvolvimento da cardiomiopatia na doença de Chagas.

### 1.7.1. TGF- $\beta$ e infecção experimental: in vitro e in vivo

O primeiro estudo relacionando o TGF- $\beta$  na doença de Chagas foi realizado em 1991 por Silva e cols.. Foi observado que quando macrófagos peritoneais de camundongos e macrófagos de humanos eram tratados com TGF- $\beta$ , a capacidade tripanossomicida do IFN- $\alpha$  era inibida. Além disto, o tratamento de macrófagos humanos com TGF- $\beta$  resultou no aumento da replicação do parasita nestas células, e *in vivo* o efeito do TGF- $\beta$  levou ao aumento da parasitemia e morte dos animais. Assim, foi possível sugerir pela primeira vez que o TGF- $\beta$  produzido durante a infecção aguda pelo *T. cruzi* é um potente inibidor das respostas geradas por macrófagos mediadas por INF- $\alpha$ .

Em 1995, a participação do TGF- $\beta$  na invasão do *T. cruzi* em células de mamíferos foi descrita utilizando células epiteliais mutadas para os genes dos receptores de TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI e T $\beta$ RII) (Ming e cols., 1995). Foi observado que a via de sinalização de TGF- $\beta$  é um meio importante para o sucesso da invasão e replicação do *T. cruzi* na célula hospedeira. Neste trabalho, foi observado que o *T. cruzi* não conseguiu penetrar e se multiplicar no interior das células mutantes, e através da transfecção com os genes dos receptores, a invasão nestas células era restaurada. Assim, Ming e cols. relataram pela primeira vez um possível mecanismo de invasão envolvendo o TGF- $\beta$  e sua via de sinalização.

Além disso, Zhang e cols. (1996) observaram que os níveis de TGF- $\beta$  estão aumentados precocemente mediante a infecção pelo *T. cruzi* em corações de camundongos. Um estudo utilizando primatas infectados pelo *T. cruzi* demonstrou que o TGF- $\beta$  é produzido já na primeira semana da fase

aguda e é constantemente expresso durante a fase crônica da infecção (Samudio e cols., 1999).

Trabalhos *in vitro* demonstraram que o TGF- $\beta$  desempenha papel importante na modulação da infecção na doença de Chagas. Nosso grupo demonstrou que a utilização de anticorpo anti-TGF- $\beta$  inibe a infecção de cardiomiócitos pelo *T. cruzi* e que estes parasitos eram capazes de ativar o TGF- $\beta$  latente. Sugerindo assim que o TGF- $\beta$  e sua ativação são necessários para a internalização do parasito nas células de mamíferos (Waghbi e cols., 2005a). Outro estudo do grupo demonstrou que as formas amastigotas captam e internalizam o TGF- $\beta$  do hospedeiro, estocando-o. Estas observações representam o primeiro exemplo de um novo mecanismo pelo qual um protozoário primitivo pode utilizar moléculas de células hospedeiras, como o TGF- $\beta$ , para controlar o seu próprio ciclo de vida intracelular (Waghbi e cols., 2005b).

Tendo em vista o amplo envolvimento do TGF- $\beta$  na infecção pelo *T. cruzi* e consequente evolução da doença de Chagas, iniciou-se o desenvolvimento de trabalhos com o objetivo de avaliar a ação de inibidores de TGF- $\beta$  e das proteínas envolvidas na via de sinalização do TGF- $\beta$ . Em 2007, Waghbi e cols. analisaram o papel do inibidor do T $\beta$ RI (SB-431542) em um modelo de infecção *in vitro*. Foi observado que o composto é capaz de diminuir a invasão dos cardiomiócitos pelo *T. cruzi*, reduzir o número de parasitas por células infectadas e reduzir a diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas ao final do ciclo, demonstrando que o SB-431542 poderia ser testado como fármaco para o tratamento da doença de Chagas (Waghbi e cols., 2007).

A atividade dos inibidores do TGF- $\beta$  também foi demonstrada no modelo de infecção animal. Foi avaliada a ação terapêutica dos inibidores SB-431542 e GW788388 durante a fase aguda da doença de Chagas experimental. Foi observado que os tratamentos com os compostos diminuem a parasitemia, a mortalidade, a fibrose e a disfunção elétrica no coração dos animais infectados.

A inibição da via de sinalização de TGF- $\beta$  *in vivo*, parece atenuar significativamente a infecção evitando danos agressivos ao coração dos animais infectados (Waghabi e cols., 2009a; de Oliveira e cols., 2012).

Outro estudo *in vivo* desenvolvido pelo grupo, analisou a cinética da atividade da via de sinalização de TGF- $\beta$ , envolvendo os seus receptores e as proteínas sinalizadoras durante a fase aguda da doença de Chagas experimental. Foi observado que a infecção pelo *T. cruzi* aumentou significativamente a expressão dos receptores: T $\beta$ RI e T $\beta$ RII; e a fosforilação das proteínas da via de sinalização clássica: Smad2/3 e, alternativa: JNK, p38, ERK. Esse aumento coincidiu com a maior expressão de proteínas responsivas ao TGF- $\beta$ : CTGF e fibronectina; e com o aumento da deposição de colágeno. Estes dados confirmam mais uma vez a importância do TGF- $\beta$  no desenvolvimento e manutenção do dano cardíaco em resposta à infecção pelo *T. cruzi* (RR Ferreira, Monografia de final de curso, 2012).

### **1.7.2. TGF- $\beta$ e doença de Chagas crônica: estudos clínicos**

Araújo-Jorge e cols. (2002) observaram que pacientes portadores da doença de Chagas crônica têm níveis mais elevados (em média de 10-20 vezes) de TGF- $\beta$ 1 quando comparados com indivíduos saudáveis. Recentemente, nosso grupo demonstrou o importante valor preditivo do TGF- $\beta$ 1 como biomarcador de progressão clínica na doença de Chagas, no qual pacientes em estágios iniciais da fase crônica que apresentavam altos níveis de TGF- $\beta$ 1 circulantes evoluíram com pior prognóstico após 10 anos de acompanhamento (Saraiva e cols., 2013). Outro papel importante do TGF- $\beta$  é o seu envolvimento na homeostase do tecido cardíaco, atuando como regulador da proliferação e morte celular, remodelagem da matriz extracelular e angiogênese (revisto por Araújo-Jorge e cols., 2012). Sendo assim, esta citocina é uma molécula chave a ser estudada em doenças infecciosas que danificam o tecido cardíaco, como é o caso da doença de Chagas. Análises imunohistoquímicas de biópsias cardíacas de pacientes portadores da CCC com disfunção cardíaca moderada ou grave mostraram intensa marcação para

fibronectina na matriz extracelular e Smad 2 fosforilada (um marcador para a ativação da via de sinalização de TGF- $\beta$ ). Esses resultados sugerem um papel importante do TGF- $\beta$  na regulação de processos fibróticos, por ter sua via de sinalização ativada sendo associada a uma maior produção de fibronectina em pacientes com CCC (Araújo-Jorge, 2002).

A susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas e suas manifestações clínicas podem ser influenciadas por fatores genéticos do hospedeiro (Ayo e cols., 2013). Estudos anteriores buscando associação de polimorfismos genéticos de citocinas com a evolução da doença de Chagas já foram realizados (revisto por Vasconcelos e cols., 2012). Na população mexicana, o polimorfismo -511C/T no gene IL-1 teve associação com susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas enquanto que o SNP na posição -308 do gene de TNF- $\alpha$  foi associado a cardiopatia (Rodríguez-Pérez, 2005; Cruz-Robles e cols., 2009). Considerando o papel fundamental do TGF- $\beta$  no desenvolvimento da doença de Chagas, acima relatado, estudos com base genética são necessários para elucidar possíveis mecanismos e associações do TGF- $\beta$ 1 à susceptibilidade e desenvolvimento da doença.

### **1.8. O gene: TGF- $\beta$ 1**

Este gene codifica um importante membro da família TGF- $\beta$ : o TGF $\beta$ -1, que é peptídeo multifuncional. O mapeamento do gene TGF- $\beta$ 1 foi realizado em 1986 por Fujii e cols. Eles observaram por hibridação de células somáticas e por hibridização *in situ*, que o gene de TGF- $\beta$ 1 está localizado em humanos, no braço longo do cromossomo 19 na posição q13.1 (Figura 1.4). E em 1987, Derynck e cols. através da análise da sequência de duas bibliotecas de DNA genômico humano, identificaram que o gene de TGF- $\beta$ 1 possui sete exons distintos e seis regiões intrônicas.

Mais de dez diferentes polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) já foram descritos tanto para a região promotora quanto para a região codificante no gene de TGF- $\beta$ 1. E mais de cem SNPs e outras variantes genéticas foram identificadas nos genes envolvidos na via de sinalização do TGF- $\beta$ : T $\beta$ RI, T $\beta$ RII, SMAD2, SMAD3, SMAD4 e SMAD7. Estes polimorfismos têm sido associados a doenças humanas (Watanabe e cols., 2002). E recentemente, foi observado que a produção de TGF- $\beta$ 1 pode ser influenciada por polimorfismos na sequência do gene de TGF- $\beta$ 1 (Yokota e cols., 2000; Yamada e cols., 2002).

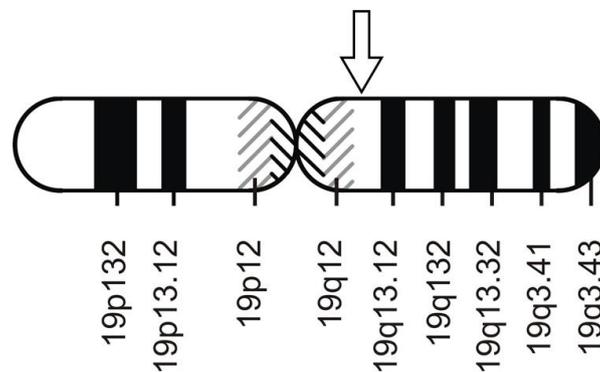


Figura 1.5: Esquema mostrando as regiões do cromossomo 19, evidenciando a posição do gene TGF- $\beta$ 1.

### 1.8.1. Principais SNPs no gene de TGF- $\beta$

#### 1.8.1.1. Região promotora: -800G>A

O polimorfismo na posição -800G>A (rs1800468) pode atuar na susceptibilidade ao desenvolvimento de algumas doenças e na regulação da transcrição do gene de TGF- $\beta$ 1. Este SNP resulta na substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A). A presença do alelo A nesta posição pode diminuir a afinidade de ligação dos fatores de transcrição da família CREB, desta forma, regulando negativamente a transcrição gênica (Grainger e cols., 1999; Syrris e cols., 1998; Amani e cols., 2004). Este polimorfismo está

associado ao desenvolvimento de infecção do trato urinário e refluxo vésico-ureteral (Coreia), colite ulcerativa (Irã), câncer colo-retal (Irã), doença pulmonar obstrutiva crônica (Turquia) (Yim, 2007 e cols., 2007; Tamizifar e cols., 2008; Amirghofra e cols., 2009; Melek e cols., 2013).

#### **1.8.1.2. Região promotora: -509C>T**

Outro polimorfismo muito estudado, que influencia na transcrição gênica do TGF- $\beta$ 1 e está envolvido no desenvolvimento de doenças é o -509C>T (rs1800469). Localizado também na região promotora, este SNP resulta na troca de uma citosina (C) por uma timina (T). Uma vez que o polimorfismo -509 está localizado numa importante região reguladora, é possível que a troca C>T altere a regulação do gene de TGF- $\beta$  e explique alguns relatos de superexpressão do TGF- $\beta$ 1 (Luedeking, 2000). Além disto, a presença do alelo T pode afetar a ligação do fator de transcrição YY1, o que resulta no aumento da transcrição do gene de TGF- $\beta$ 1 (Hobbs, 1998). Assim, indivíduos que são carreadores do alelo C nesta posição podem apresentar menores concentrações plasmáticas de TGF- $\beta$ 1 (van der Wal e cols., 1993; Grainger e cols., 1999). Este SNP está associado ao desenvolvimento de isquemia miocárdica silenciosa (México), hepatite C (Egito), câncer de estômago (Índia), infarto do miocárdio (Irã), AVC (Roterdã) (Cruz e cols. 2013; Pasha e cols., 2013, Bhayal e cols., 2011; Najjar e cols., 2001; Mark e cols., 2006;).

#### **1.8.1.3. Exon 1: códon 10T>C**

No exon 1 do gene do TGF- $\beta$ 1, o polimorfismo na posição +869 (códon 10 - rs1800470) resulta na substituição de uma timina por uma citosina. Dados da literatura demonstraram que este SNP leva a uma mudança na estrutura primária da proteína. O polimorfismo presente na posição +869 do gene TGF- $\beta$ 1 resulta na mudança do aminoácido leucina (apolar) para prolina (apolar) no códon 10. Isto altera a região hidrofóbica do peptídeo, aumentando o seu padrão de ligação com o complexo de proteína associado a translocação desta proteína (translocon). Essas alterações podem afetar o transporte de TGF $\beta$ -1

para o retículo endoplasmático, contribuindo para a produção dessa citocina (Susianti e cols., 2014b). Este polimorfismo está associado ao desenvolvimento de comportamento suicida (Omrani e cols., 2012); leucariose isquêmica (Tao e cols., 2011) e púrpura trombocitopênica idiopática (Pehlivan e cols., 2011).

#### **1.8.1.4. Exon 1: códon 25G>C**

O polimorfismo na posição +915 (códon 25) do exón 01 (rs1800471) do gene TGF- $\beta$ 1 é caracterizado pela alteração de uma G por uma C resultando na mudança de um aminoácido arginina (básico) para um aminoácido prolina (apolar). As alterações na posição 915 do códon 25 pode afetar as propriedades do peptídeo inibindo o transporte do TGF- $\beta$ 1 para o retículo endoplasmático e, eventualmente, o declínio da produção desta citocina (Susiante e cols., 2014a). Este SNP está associado ao desenvolvimento de algumas doenças, tais como: osteonecrose e miocardiopatia dilatada idiopática na Grécia (Samara e cols., 2012; Adamopoulos e cols., 2011) e hipertrofia do VE na China (Ying Xu e cols., 2010).

#### **1.8.1.5. Exon 5: códon 263C>T**

Mais um importante SNP existente no gene de TGF- $\beta$ 1 é observado no exón 5 na posição +788 do códon 263 (rs1800472). Este polimorfismo é observado pela mudança do alelo citosina para o alelo timina, resultando em uma modificação na cadeia primária da proteína. O polimorfismo na posição +788 do codón 263 resulta na troca de aminoácido. A substituição do aminoácido treonina (polar) pelo isoleucina (apolar) no códon 263 afeta a estabilidade do TGF- $\beta$ 1 (Stoll e cols., 2004; Atilla e cols., 2006). Por estar localizado próximo ao sítio de clivagem do peptídeo associado à latência (LAP), este polimorfismo pode também estar envolvido nos processos de ativação do TGF- $\beta$ 1 (Koch e cols., 2006). O comprometimento do processo de ativação do TGF- $\beta$ 1 pode impedir o reconhecimento pelos seus receptores de superfície, inibindo o desempenho de suas funções biológicas. O polimorfismo no códon

263 está associado ao desenvolvimento da fissura lábio-palatina (Alemanha) e periodontite crônica (Turquia) (Stoll e col., 2004; Atilla e cols., 2006).

### **1.9. Polimorfismo no gene de TGF- $\beta$ e a doença de Chagas**

Em 2009, foi realizado estudo com pacientes portadores da doença de Chagas em coortes do Peru e Colômbia a fim de identificar a associação de polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas. Calzada e cols. observaram que o alelo T que está associado à baixa produção de TGF- $\beta$ 1 foi encontrado mais frequentemente em indivíduos saudáveis do que nos cardiopatas portadores de doença de Chagas. Reciprocamente, a frequência do alelo C no códon 10 foi maior no grupo de pacientes infectados pelo *T. cruzi*, indicando que este alelo seja um provável fator de risco para a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas.

### **1.10. Justificativa**

Com mais de uma década de pesquisa envolvendo a doença de Chagas, já foi possível identificar forte evidência da influência dos fatores genéticos do hospedeiro sobre a evolução clínica da doença. O reconhecimento da associação entre os polimorfismos de genes específicos, que influenciam na infecção pelo *T. cruzi* e no desenvolvimento da doença, poderia contribuir para o mapeamento de genes de suscetibilidade ou resistência à doença de Chagas. Esta caracterização dos genes de susceptibilidade e seus SNP têm implicações importantes, não só para uma melhor compreensão da patogênese, mas também para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de acompanhamento clínico. Portanto, estudos investigando a associação entre os polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com diferentes coortes são necessários para esclarecer a relação entre o genótipo, o desenvolvimento da doença e suas manifestações clínicas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar se há correlação entre a presença de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) no gene do TGF- $\beta$ 1 e a manifestação clínica da doença de Chagas na coorte de pacientes do Instituto Nacional de Infectologia (INI), Fiocruz (Brasil).

### **2.2. Objetivos Específicos**

Analisar o padrão de frequência dos alelos do gene do TGF- $\beta$ 1 na fase crônica indeterminada, nos diversos estágios da fase crônica cardíaca e indivíduos controle;

Correlacionar o padrão de frequência dos alelos do gene do TGF- $\beta$ 1 entre indivíduos controle e pacientes com doença de Chagas na fase crônica;

Avaliar a associação do padrão de frequência dos alelos do gene do TGF- $\beta$ 1 entre pacientes na forma indeterminada e pacientes com CCC;

Correlacionar o padrão de frequência dos alelos do gene do TGF- $\beta$ 1 entre pacientes da forma cardíaca em estágios iniciais e avançados;

Determinar os níveis séricos do TGF- $\beta$ 1 e BNP em pacientes na fase crônica indeterminada e nos diversos estágios da fase crônica cardíaca e;

Correlacionar os padrões de frequência dos alelos do gene do TGF- $\beta$ 1 com os níveis séricos do TGF- $\beta$ 1, BNP e FE.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1. Desenho experimental**

O presente estudo foi realizado de forma seccional. Os pacientes foram recrutados, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e em seguida realizaram as coletas no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI). As amostras de identificadas foram encaminhadas ao Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática – IOC/Fiocruz. Pesquisadores cegos para a classificação clínica dos pacientes analisaram o padrão de frequência dos alelos do gene TGF- $\beta$ 1 e dosaram os níveis séricos do TGF- $\beta$ 1 e BNP. A guarda dos dados clínicos dos pacientes ficou exclusivamente restrita ao pesquisador do INI até o término de todos os experimentos. Após isso, o cegamento foi quebrado e foram realizadas as análises estatísticas correlacionando o padrão de expressão dos alelos do gene do TGF- $\beta$ 1 com a apresentação clínica da doença e controle; e os níveis séricos da citocina e do neuro-hormônio foram correlacionados com a frequência dos alelos do gene do TGF- $\beta$ 1 e com as formas de apresentação da doença.

#### **3.2. Considerações éticas**

Os procedimentos realizados no presente trabalho foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, CAAE: 02826212.6.0000.5262, sob responsabilidade do pesquisador Roberto Magalhães Saraiva. Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, seguindo as regras de boas práticas clínicas.

#### **3.3. Critérios de inclusão e exclusão**

Participaram do estudo pacientes portadores da doença de Chagas com sorologia positiva (confirmados pelas técnicas de ELISA e imunofluorescência indireta) em forma crônica indeterminada ou crônica cardíaca e indivíduos controle com histórico epidemiológico positivo e sorologia negativa para doença de Chagas. Foram excluídos do estudo pacientes grávidas, portadores de co-morbidades que

interferem na classificação da forma clínica, co-infecção, forma digestiva associada, tratamento prévio com BZ e material coletado inadequadamente para análise.

### **3.4. Recrutamento dos pacientes**

Os pacientes na fase crônica foram convidados a participar do projeto durante a consulta de rotina. Os controles foram recrutados entre os indivíduos que procuram a equipe médica com o intuito de esclarecerem se possuem a doença de Chagas. Nessa visita, o projeto é apresentado em detalhes, o termo de consentimento livre e esclarecido é assinado, seguindo as normas de boas práticas clínicas. Em seguida, os pacientes foram encaminhados ao setor de coleta do INI.

### **3.5. População do estudo**

O presente estudo incluiu pacientes portadores da doença de Chagas crônica e indivíduos em investigação para doença de Chagas atendidos no INI. Estes pacientes foram estratificados de acordo com o Consenso Brasileiro para doença de Chagas (2005), no qual a fase crônica cardíaca é classificada da seguinte forma: Estágio A – ECG alterado e ECO normal; Estágio B – ECG alterado e ECO com alteração global ou segmentar da função sistólica do ventrículo esquerdo sem clínica de IC subdividido em B1: fração de ejeção (FE) do VE  $\geq 45\%$  e B2: FE  $\leq 45\%$ ; Estágio C – IC não refratária; Estágio D – IC refratária. A caracterização do quadro clínico foi realizada através da coleta de dados no prontuário e entrevistas com os pacientes. Assim, foram coletados dados demográficos, idade, sexo, sintomatologia, achados do ECG e ECO, co-morbidades, hábitos de vida e medicamentos em uso. Estes dados orientaram a classificação dos pacientes nas formas da doença de Chagas.

### 3.6. Coleta e processamento do material biológico

O detalhamento das diferentes fases da coleta e locais onde ocorrem os processamentos do material biológico encontra-se na figura 3.1.

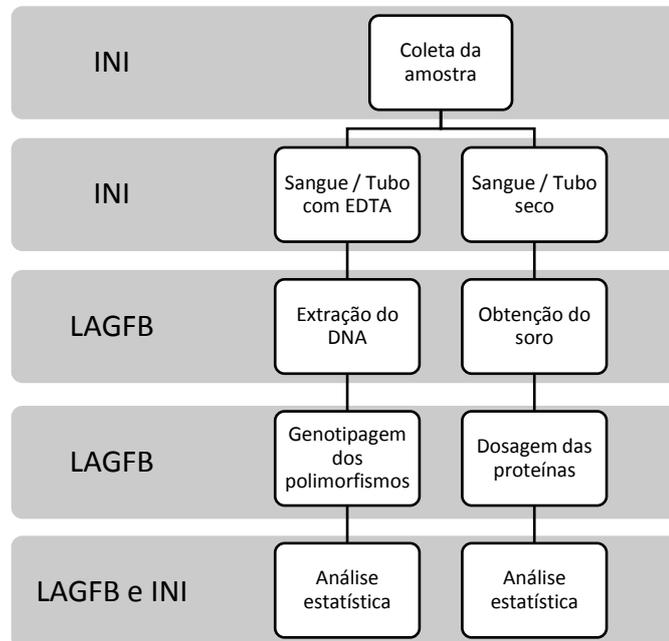


Figura 3.1: Fluxograma evidenciando as principais etapas e locais do processamento da amostra.

#### 3.6.1. Coleta do sangue

Dez mL de sangue total periférico dos pacientes foram coletados por punção venosa. Cinco mL em tubos vacutainer (BD Vacutainer® Blood Collection Tubes) com anticoagulante para extração do DNA genômico e cinco mL em tubos vacutainer (BD Vacutainer® Blood Collection Tubes) sem anticoagulante, para obtenção do soro e análise dos valores séricos do TGF- $\beta$ 1 e BNP. Após toda a manipulação necessária, as amostras foram aliquotadas em tubos criogênicos de 2,0 mL e encontram-se armazenados no Banco de Sangue e Soro (-70°) do LAGFB/IOC sob responsabilidade da Dra. Mariana Caldas Waghbi e Dr. Roberto Magalhães Saraiva.

### **3.6.2. Extração do DNA genômico**

Cem  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram submetidos à extração de DNA com DNeasy® Blood & Tissue Kit, segundo protocolo do fabricante (QIAGEN Ltda., Crawley, Reino Unido). O DNA extraído foi analisado em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 1x, com marcador de peso molecular de 1Kb DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) corado com brometo de etídio. A qualidade e quantidade do DNA foi obtida através da excitação por luz ultravioleta no GelDoc™ XR+ Systems e foto documentada utilizando o Programa Quantity One (Bio-Rad). Além disto, para dosagem mais precisa do DNA extraído, a concentração foi mensurada por fluorometria utilizando o dsDNA HS Assay Kit e a leitura foi realizada no Qubit® 2.0. Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Desta forma, identificamos que as amostras apresentaram concentração aproximada de 20-40ng/mL. Os tubos de DNA estoque encontram-se armazenados no Banco de DNA (-70°) do LAGFB/IOC sob responsabilidade da Dra. Mariana Waghbi e Dr. Roberto Magalhães Saraiva.

### **3.6.3. Obtenção do soro**

Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos e o soro obtido foi aliquotado em tubos criogênicos de 2.0 mL. Estes tubos foram armazenados no Banco de Soro (-70°) do LAGFB/IOC sob responsabilidade da Dra. Mariana Caldas Waghbi e Dr. Roberto Magalhães Saraiva.

## **3.7. Genotipagem**

### **3.7.1. SNP do gene de TGF- $\beta$ 1**

Após busca na literatura, cinco SNPs do gene de TGF- $\beta$ 1 relacionados a problemas cardíacos e processos fibróticos foram selecionados e avaliados na população do estudo: na região promotora: rs1800468 (-800G>A) e rs1800469 (-509C>T); no exon 01: rs1800470 (+10T>C) e rs1800471 (+25G>C); e exon 05: rs1800472 (+263C>T) (Tabela 3.2).

Tabela 3.1: Características gerais dos SNP do gene de TGF- $\beta$ 1 selecionados.

Região	SNP	Troca	Código dbSNP
Promotora	-800	G>A	rs1800468
	-509	C>T	rs1800469
Exon 01	+10	T>C	rs1800470
	+25	G>C	rs1800471
Exon 05	+263	C>T	rs1800472

### 3.7.2. Desenho dos oligonucleotídeos

Baseado na sequência de referência depositada no NCBI (NG\_013364 | Homo sapiens transforming growth factor, beta 1 (TGF- $\beta$ 1)), oligonucleotídeos foram desenhados para as regiões de interesse (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Características gerais dos pares de oligonucleotídeos utilizados para identificação dos polimorfismos.

Oligonucleotídeo	Sequência	Fragmento (pb)
Região promotora	(S)5`-cagttggcgagaacagttgg-3` (AS)5`-agaacggaaggagagtcagg-3`	594
Exon 01	(S)5`-attcaagaccaccaccttc-3` (AS)5`-gctcagtgccatcctcttt-3`	730
Exon 05	(S)5`-tttgctccttcctccttc-3` (AS)5`-gttcttacaccagacctcatc-3`	700

### 3.7.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

A PCR convencional foi realizada utilizando o kit PCR Master Mix (Promega Madison, Wisconsin, USA). Para verificar a temperatura de anelamento ideal para cada oligonucleotídeo e para amplificação exponencial da região de interesse. As condições da reação da PCR foram: preincubação a 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos com temperatura de desnaturação a 94°C por 30 segundos; a temperatura de anelamento foi ajustada de acordo com cada oligonucleotídeo (Região promotora: 59° / Exon 01: 62° / Exon 05: 61°C) por 30 segundos e a temperatura de extensão a 72°C por 30 segundos. Na etapa final da PCR, utilizamos uma temperatura a 72°C por 7 minutos. Os produtos finais da PCR (5µl) foram aplicados em um gel de agarose a 2% em tampão TBE1x e corados com brometo de etídeo.

### 3.7.4. Purificação dos produtos amplificados e Sequenciamento

Os fragmentos obtidos com a PCR foram purificados utilizando o Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Em seguida, as amostras foram submetidas ao sequenciamento automático de 96 capilares ABI-3730xl (Applied Biosystem, EUA) conforme descrito por Otto e cols. (2008). Este ensaio foi realizado na plataforma de Sequenciamento de DNA do PDTIS/FIOCRUZ. A qualidade das sequências foi observada utilizando o *software* Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd) e alinhadas à sequência referência no *software* BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall).

### 3.8. Quantificação dos níveis séricos TGF-β1 e BNP

A dosagem das proteínas TGF-β1 e BNP foi realizada pelo método de ELISA utilizando, respectivamente, os kits Quantikine ELISA Human ImmunoAssay (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e Peptide Enzyme Immunoassay (Peninsula Laboratories Inc., Bachem Group, San Carlos, CA, EUA). Os experimentos seguiram conforme as recomendações do fabricante. As medidas de absorbância foram obtidas, contra o branco, em um leitor de microplacas da Molecular Devices com filtro de 450nm. As leituras foram obtidas no programa SoftMax Pro Software. Todas

as amostras foram testadas em duplicata e a média das leituras foi considerada para a análise.

### **3.9. Análise estatística**

#### **3.9.1. Cálculo do tamanho amostral**

Para o cálculo do tamanho amostral, foi levado em consideração a prevalência de 30% do alelo T do TGF- $\beta$ 1 em uma população com doença de Chagas (Calzada e cols, 2009). Supondo que haja uma prevalência deste alelo 30% maior (39%) nos pacientes em estágios avançados da doença de Chagas (estágios C e D) e 30% menor (21%) em pacientes na fase indeterminada, calculamos ser necessário a inclusão de ao menos 100 pacientes neste estudo (erro  $\alpha$  de 5% e erro  $\beta$  de 20%; análise feita através do programa MedCalc 9.2.0.2). Foi incluído também um grupo controle composto por 29 indivíduos.

#### **3.9.2. Frequências alélicas e genotípicas**

A associação dos genótipos e alelos à doença de Chagas e sua progressão foram realizadas utilizando o teste de Qui-Quadrado. Este também foi utilizado para investigar se as frequências genotípicas do grupo de indivíduos controle e pacientes estavam em equilíbrio genético de Hardy-Weinberg. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Estas análises foram realizadas através do software IBM SPSS Statistics 22.0.

#### **3.9.3. Diferenças entre os parâmetros quantitativos**

As variáveis com distribuição normal foram apresentadas na forma de média e desvio padrão (DP). Posteriormente suas diferenças foram testadas entre os grupos analisados através do teste t-student. Para a variação dos parâmetros entre os diferentes estágios da evolução clínica cardíaca da doença de Chagas foram realizados testes One-Way ANOVA e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Estas análises foram realizadas através dos *softwares* IBM SPSS Statistics 22.0 e GraphPad Prism 5.01.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Descrição da população do estudo**

#### **4.1.1. Pacientes**

Foram recrutados um total de 203 pacientes para o projeto, sendo que 4 não consentiram, 13 consentiram mas não compareceram ao setor de coleta de sangue, e 5 foram excluídos (2 com forma digestiva associada, 1 com tratamento prévio com benznidazol, 1 com co-infecção com hepatite C e 1 teve o sangue hemolisado). Assim, a população final estudada foi constituída por 181 indivíduos recrutados no serviço do ambulatório do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (FIOCRUZ/RJ): 29 controles, 53 pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas e 99 pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas (24 no estágio A, 25 no estágio B, 44 no estágio C e 6 no estágio D).

Através dos dados obtidos dos pacientes que participaram do estudo, realizamos uma análise segmentar da origem, faixa etária e gênero dos indivíduos analisados (Figura 4.1). Dessa forma, concluímos que a maioria (63,8%) dos indivíduos são naturais da região nordeste do Brasil, seguido da região sudeste (27,3%) e pequeno número das regiões norte, centro-oeste e sul (4,3%) (Figura 4.1A). A estratificação por faixa etária mostra que aproximadamente 29% dos pacientes tem menos de 50 anos, 31% se encontram na faixa etária de 51-59 anos e 39% dos indivíduos tem mais de 60 anos (Figura 4.1B). Em relação ao gênero da população, identificamos que 58% dos indivíduos são do gênero feminino e, conseqüentemente, 42% masculino (Figura 4.1C).

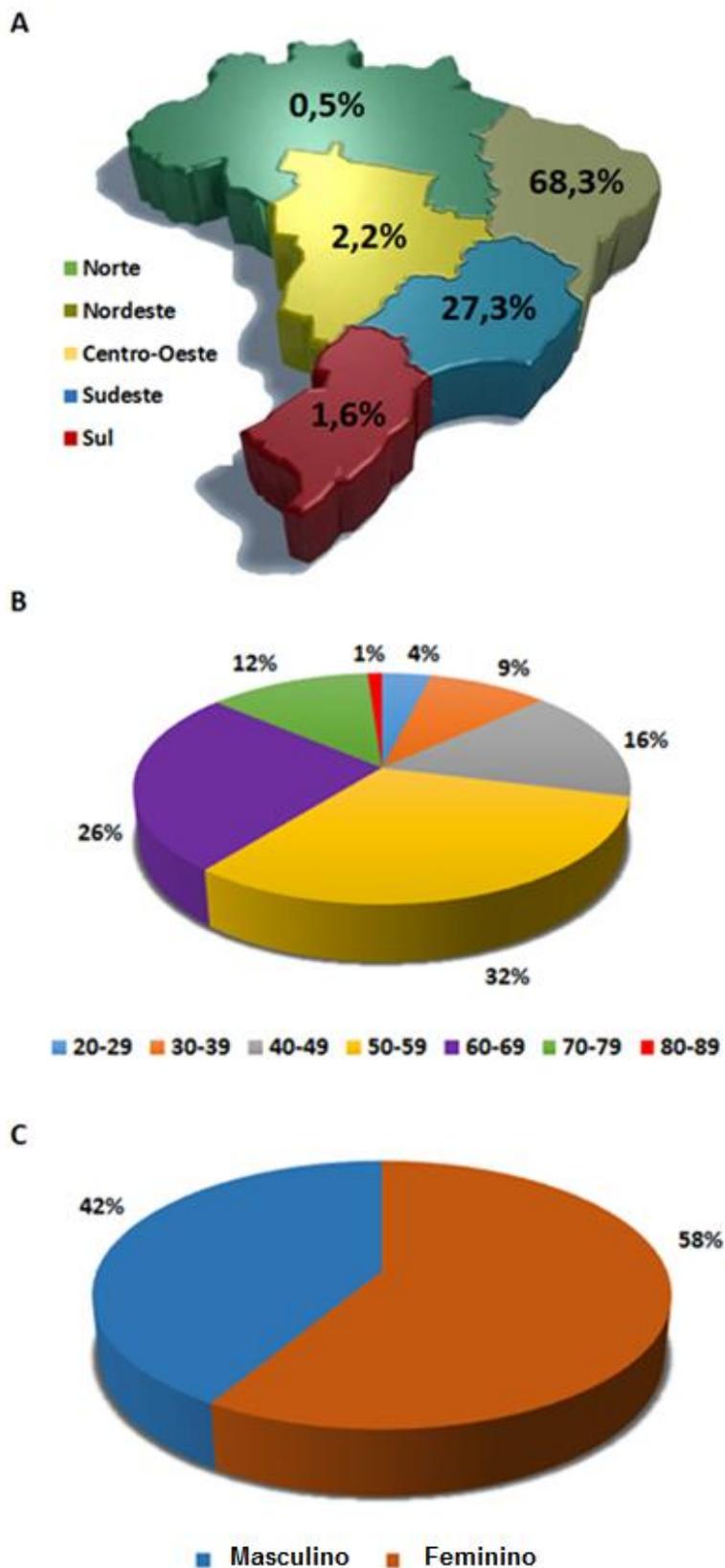


Figura 4.1: Informações obtidas durante a consulta médica no grupo de indivíduos controle e pacientes portadores da doença de chagas incluídos no estudo: (A) Naturalidade, (B) Faixa Etária e (C) Gênero.

Outras características clínicas dos pacientes estão descritas na Tabela 4.1 Os pacientes dos grupos em estágio A+B e em estágio C+D eram mais idosos significativamente que controles e indeterminados ( $p < 0,05$ ). Pacientes em estágio A+B eram mais frequentemente oriundos da região Sudeste (43%) do que os em forma indeterminada ou nos estágios C+D (24%) ( $p < 0,05$ ). Não houve significância estatística entre as análises para a frequência de sexo masculino, naturalidade das demais regiões do Brasil, hipertensão, diabetes mellitus, coronariopatia, dislipidemia e tabagismo.

#### **4.1.2. Características eletrocardiográficas e ecocardiográficas**

Como esperado, as alterações eletrocardiográficas foram mais prevalentes nos pacientes com forma cardíaca, devido à classificação seguida no projeto, descrita na seção de Metodologia. Os pacientes com a forma indeterminada, por definição, não apresentavam nenhuma alteração eletrocardiográfica definidora de forma cardíaca da doença de Chagas. Apenas 1 paciente com forma indeterminada apresentava baixa voltagem e 2 hemibloqueio anterior esquerdo que quando presentes de forma isolada não caracterizam forma cardíaca da doença de Chagas.

Entre os indivíduos controle, também observamos alguns indivíduos com alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas, já que o critério de inclusão de controles usado neste projeto não excluía pessoas com doença conhecida (Tabela 4.2). Dos 29 indivíduos controle recrutados para o presente estudo, 23 apresentavam algum tipo de acometimento ou disfunção cardíaca, tais como: alteração primária da repolarização ventricular e da fração de ejeção, bloqueio completo de ramo direito, hemibloqueio anterior esquerdo, entre outros, representando 80% do grupo.

Tabela 4.1. Características clínicas dos indivíduos analisados

	<b>Controles</b> <b>n=29</b>	<b>Indeterminados</b> <b>n=53</b>	<b>Estágios A+B</b> <b>n=49</b>	<b>Estágios C+D</b> <b>n=50</b>
<b>Idade</b>	50±16	52±11	61±10*†	58±13*†
<b>Masculino</b>	9 (31%)	24 (45%)	16 (33%)	26 (52%)
<b>Naturalidade</b>				
Norte	0	0	0	1 (2%)
Nordeste	20 (69%)	42 (79%)	27 (55%)	35 (70%)
Centro-Oeste	0	0	1 (2%)	2 (4%)
Sudeste	9 (31%)	8 (15%)	21 (43%)†	12 (24%)‡
Sul	0	3 (5%)	0	0
<b>Hipertensão</b>	16 (55%)	25 (47%)	26 (53%)	21 (42%)
<b>Diabetes</b>	7 (24%)	6 (11%)	4 (8%)	5 (10%)
<b>Coronariopatia</b>	2 (7%)	1 (2%)	1 (2%)	1 (2%)
<b>Dislipidemia</b>	7 (24%)	12 (23%)	15 (31%)	13 (26%)
<b>Tabagismo</b>	0	2 (4%)	3 (6%)	1 (2%)
<b>Medicamento</b>				
IECA	-	15 (28%)	12 (24%)	19 (38%)
Espiro lactona	-	0	2 (4%)	30 (60%)
Carvedilol	-	0	10 (20%)	36 (72%)
Amiodarona	-	0	5 (10%)	16 (32%)
BRA	-	4 (8%)	14 (29%)	16 (32%)
Furose mida	-	0	6 (12%)	36 (72%)
Digoxina	-	0	2 (4%)	14 (28%)
Nitrato	-	1 (2%)	0	5 (10%)
Varfarina	-	0	8 (16%)	18 (36%)
HCTZ	-	13 (25%)	15 (31%)	9 (18%)
Sinvastatina	-	16 (30%)	14 (29%)	16 (32%)
Hidralazina	-	0	0	1 (2%)

\*comparação entre grupos A+B e C+D com o grupo controle ( $p<0,05$ );

†comparação entre grupos A+B e C+D com o grupo de pacientes indeterminados ( $p<0,05$ );

‡comparação entre o grupo C+D com o grupo de pacientes A+B ( $p<0,05$ ).

Já os pacientes portadores da CCC, observamos que as alterações eletrocardiográficas mais comuns no grupo de pacientes em estágio A+B eram o bloqueio completo do ramo direito (BRD) de 46,9% e o hemibloqueio anterior esquerdo (HBAE) presente em 40,8% dos pacientes. No grupo de pacientes

dos estágios C+D, além das alterações previamente descritas, também identificamos a presença de pacientes com alteração primária da repolarização ventricular (APRV) representando 46% dos indivíduos analisados (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Características Eletrocardiográficas dos indivíduos participantes do estudo

	<b>Controles</b> n=29 (%)	<b>IND</b> n=53 (%)	<b>A+B</b> n=49 (%)	<b>C+D</b> n=50 (%)
<b>MP</b>	0	0	6 (12,2%)	12 (24%)
<b>BRD</b>	4 (16%)	0	23 (46,9%)	23 (46%)
<b>BV</b>	0	1 (1,9%)	4 (8,2%)	10 (20%)
<b>HBAE</b>	3 (10,3%)	2 (3,8%)	20 (40,8%)	23 (46%)
<b>ZEI</b>	1 (3,4%)	0	5 (10,2%)	7 (14%)
<b>APRV</b>	4 (16%)	0	17 (34,7%)	24 (46%)

APRV: alteração primária da repolarização ventricular; BRD: bloqueio completo de ramo direito; BV: baixa voltagem; HBAE: hemibloqueio anterior esquerdo; MP: marcapasso; ZEI: zona elétrica inativa.

Em relação aos dados ecocardiográficos, entre os controles (n=29) havia um único paciente com disfunção sistólica. Em termos de disfunção diastólica, 55% dos controles tinham função diastólica normal, 31% déficit de relaxamento, 6,9% padrão pseudo-normal e em 6,9% a função diastólica não pôde ser classificada devido à fibrilação atrial. O critério escolhido para definição de controle visou incluir indivíduos com história epidemiológica para doença de Chagas, desta forma esses indivíduos poderiam apresentar alterações no eletrocardiograma e ecocardiograma. Assim, a comparação entre achados ecocardiográficos de controles e pacientes em forma indeterminada não foi realizado.

Entre os pacientes com forma indeterminada (n=53), todos apresentavam função sistólica de VE preservada. A função diastólica era normal em 57% dos pacientes enquanto que 36% apresentavam déficit de relaxamento e 6% padrão pseudo-normal. Entre os pacientes no estágio A+B da forma cardíaca (n=49), 28% tinham disfunção sistólica do VE sendo 20% disfunção leve, 4% disfunção moderada e 4% disfunção grave. A função

diastólica era normal em 22,4% dos pacientes enquanto que 49% apresentavam déficit de relaxamento, 18,4% padrão pseudo-normal e em 10,2% a função diastólica não pode ser classificada devido a FA. Entre os pacientes no estágio C+D da forma cardíaca (n=50), 49 tinham disfunção sistólica do VE, sendo 14% disfunção leve, 40% disfunção moderada e 44% disfunção grave. A função diastólica era normal em 4% dos pacientes, enquanto 26% tinham déficit de relaxamento, 16% padrão pseudo-normal, 44% padrão restritivo e em 10% a função diastólica não pôde ser classificada devido a FA.

De acordo com a classificação utilizada no trabalho, observamos que os pacientes do estágio A+B apresentavam em média um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do diâmetro do átrio esquerdo, do diâmetro sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo quando comparados com indivíduos do grupo indeterminado. Esses pacientes também apresentaram uma importante diminuição da velocidade E' quando comparados com os grupos indeterminado e controle. Já os pacientes nos estágios mais graves da doença, estágios C+D, as alterações ecocardiográficas foram ainda mais marcantes, dentre estas podemos destacar: os diâmetros cavitários do átrio esquerdo e do ventrículo esquerdo cerca de 8mm maior em relação aos pacientes controles e portadores da forma indeterminada. Já a fração de ejeção do ventrículo esquerdo era aproximadamente 50% menor nos pacientes dos estágios mais graves da forma cardíaca que nos demais grupos. Em relação aos parâmetros de função diastólica do ventrículo esquerdo, as razões E/A e E/E' foram maiores e a velocidade E' foram significativamente menores nos pacientes em estágios C+D do que nos demais grupos. A pressão sistólica da artéria pulmonar também foi analisada e observamos um aumento importante nos pacientes nos estágios mais graves da forma cardíaca do que nos demais grupos do estudo (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Características ecocardiográficas dos indivíduos participantes do estudo

	Controles n=29	Indeterminados n=53	Estágios A+B n=49	Estágios C+D n=50
AE, mm	37 ± 6	36 ± 4	39 ± 5*†	45 ± 5*†‡
VEd,mm	52 ± 8	50 ± 4	54 ± 5†	68 ± 7*†‡
VEs, mm	32 ± 8	30 ± 4	35 ± 8†	56 ± 8*†‡
FE, %	68 ± 10	71 ± 7	63 ± 13†	35 ± 11*†‡
Razão E/A	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,5	1,0 ± 0,4	2,1 ± 1,3*†‡
TD, ms	168 ± 33	179 ± 59	187 ± 66	159 ± 80
E', cm/s	10,5 ± 4,6	9,4 ± 2,8	7,2 ± 2,4*†	5,3 ± 1,9*†‡
Razão E/E'	9,3 ± 3,9	8,2 ± 2,5	11,3 ± 5,7†	18,6 ± 7,9*†‡
PSAP, mmHg	26 ± 16	27 ± 9	31 ± 10	41 ± 13*†‡

A, velocidade máxima do fluxo mitral na contração atrial; AE, átrio esquerdo; E, velocidade máxima do fluxo mitral na fase de enchimento rápido; E', velocidade máxima do deslocamento miocárdio no início da diástole; FE, fração de ejeção; PSAP, pressão sistólica de artéria pulmonar; TD, tempo de desaceleração da onda E; VEd, diâmetro do ventrículo esquerdo no final da diástole; VEs, diâmetro do ventrículo esquerdo no final da sístole.

\* comparação entre grupos A+B e C+D com o grupo controle ( $p < 0,05$ );

† comparação entre grupos A+B e C+D com o grupo de pacientes indeterminados ( $p < 0,05$ );

‡ comparação entre o grupo C+D com o grupo de pacientes dos estágios A+B ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Avaliação dos polimorfismos com a susceptibilidade ao desenvolvimento da infecção e com a progressão da doença de Chagas

Nesta primeira análise, quando avaliamos os polimorfismos associados à suscetibilidade ao desenvolvimento da doença e dos estágios clínicos da fase crônica da doença de Chagas foram estabelecidos padrões: os pacientes considerados casos foram os IND, estágios A+B e C+D e os pacientes não infectados pelo *T. cruzi* foram considerados controles.

#### 4.2.1. Região promotora do gene TGF- $\beta$ 1: -800G>A

O polimorfismo identificado com o rs1800468, é caracterizado pela alteração de uma guanina por uma adenina na posição -800 da região promotora do gene TGF- $\beta$ 1. Ao avaliar a associação deste polimorfismo com o desenvolvimento e progressão para a forma cardíaca da doença (Tabela 4.4 e 4.5), não encontramos diferenças significativas entre a distribuição das frequências genótípicas e alélicas. Desta forma, podemos considerar que o polimorfismo -800G>A não está associado ao desenvolvimento da doença, assim como não se relaciona com a progressão dos diferentes estágios clínicos da CCC.

Tabela 4.4: Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo na posição -800 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas.

	<b>Caso n = 152 (%)</b>	<b>Controle n = 29 (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>GG</b>	134 (88.15)	27 (93.10)	Referência	
<b>AG</b>	17 (11.18)	2 (6.89)	1,71 (0,39-5,19)	-
<b>AA</b>	1 (0.06)	0 (0.00)	0 (0,05-7,00)	-
<b>Alelo G</b>	19	2	Referência	
<b>Alelo A</b>	285	56	0,54 (0,19-2,25)	-

Tabela 4.5: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo na posição -800 na região promotora do gene TGF- $\beta$ 1 comparando pacientes A+B, C+D e os estágios indeterminado.

	<b>A+B</b> n = 49 (%)	<b>IND</b> n = 53 (%)	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>GG</b>	46 (93,88)	45 (84,91)	Referência	
<b>AG</b>	3 (6,12)	8 (15,09)	0,37 (0,12-1,40)	0.16
<b>AA</b>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,06-16,12)	-
<b>Alelo G</b>	95 (96,94)	98 (92,45)	Referência	
<b>Alelo A</b>	3 (3,06)	8 (7,55)	0,39 (0,13-1,43)	0.16
	<b>C+D</b> n = 50 (%)	<b>IND</b> n = 53 (%)	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>GG</b>	43 (86,00)	45 (84,91)	Referência	
<b>AG</b>	6 (12,00)	8 (15,09)	0,78 (0,27-2,33)	-
<b>AA</b>	1 (2,00)	0 (0,00)	0 (0,27-35,85)	0,31
<b>Alelo G</b>	92 (92,00)	98 (92,45)	Referência	
<b>Alelo A</b>	8 (8,00)	8 (7,55)	1,07 (0,41-2,80)	-
	<b>C+D</b> n = 50 (%)	<b>A+B</b> = 49 (%)	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>GG</b>	43 (86,00)	46 (93,88)	Referência	
<b>AG</b>	6 (12,00)	3 (6,12)	2,14 (0,54-7,25)	0.32
<b>AA</b>	1 (2,00)	0 (0,00)	0 (0,25-36,63)	0.32
<b>Alelo G</b>	92 (92,00)	95 (96,94)	Referência	
<b>Alelo A</b>	8 (8,00)	3 (3,06)	2,75 (0,75-8,42)	0.16

#### 4.2.2. Região promotora do gene TGF- $\beta$ 1: -509C>T

O polimorfismo registrado com o rs1800469 é caracterizado pela alteração de uma citosina por uma timina na posição -509 da região promotora do gene TGF- $\beta$ 1. Quando comparamos as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo nesta posição entre os pacientes infectados pelo *T. cruzi* e os indivíduos controle (Tabela 4.6) a fim de identificar a associação com a susceptibilidade a desenvolver a doença de Chagas, observamos um importante aumento na frequência do genótipo CT ( $p < 0,01$ ) e TT ( $p < 0,05$ ) no grupo de pacientes portadores da doença em relação aos indivíduos controle.

Observamos também que indivíduos portadores dos genótipos CT e TT apresentam risco, respectivamente, 4,53 (IC 95% = 1,40-14,19) e 3,17 (IC 95% = 1,06-9,53) vezes maior de desenvolver a doença do que indivíduos carreadores do genótipo CC. Estas análises sugerem que a presença do polimorfismo em heterozigose ou homozigose tem significativa associação à susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas.

Tabela 4.6: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas.

	<b>Caso</b> n = 152 (%)	<b>Controle</b> n = 29 (%)	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>CC</b>	10 (6.58)	6 (20.69)	Referência	
<b>CT</b>	68 (44.74)	9 (31.03)	4,53 (1,40-14,19)	<b>0.01</b>
<b>TT</b>	74 (48.68)	14 (48.28)	3,17 (1,06-9,53)	<b>0.05</b>
<b>Alelo C</b>	88	21	Referência	
<b>Alelo T</b>	216	37	1,39 (0,79-2,51)	0.32

Em relação às análises do polimorfismo -509C>T associado aos diferentes estágios da forma cardíaca da doença (Tabela 4.7), não encontramos diferenças significativas entre a distribuição das frequências genotípicas e alélicas entre os grupos A+B, C+D e pacientes indeterminados. Desta forma, podemos considerar que o polimorfismo -509C>T não está associado com a progressão dos diferentes estágios clínicos da CCC.

Tabela 4.7: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo na posição -509 na região promotora do gene TGF- $\beta$ 1 comparando pacientes A+B, C+D e os estágios indeterminado.

	<b>A+B</b> n = 49 (%)	<b>IND</b> n = 53 (%)	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>CC</b>	4 (8,16)	3 (5,66)	Referência	
<b>CT</b>	24 (48,98)	23 (43,40)	0,78 (0,19-3,39)	-
<b>TT</b>	21 (42,86)	27 (50,94)	0,58 (0,15-2,54)	-
<b>Alelo C</b>	32 (32,65)	29 (24,36)	Referência	
<b>Alelo T</b>	66 (67,35)	77 (72,64)	0,78 (0,43-1,41)	-

	<b>C+D</b> n = 50 (%)	<b>IND</b> n = 53 (%)	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>CC</b>	3 (6,00)	3 (5,66)	Referência	
<b>CT</b>	21 (42,00)	23 (43,40)	0,91 (0,20-4,11)	-
<b>TT</b>	26 (52,00)	27 (50,94)	0,96 (0,22-4,25)	-
<b>Alelo C</b>	27 (27,00)	29 (27,36)	Referência	
<b>Alelo T</b>	73 (73,00)	77 (73,64)	1,02 (0,56-1,86)	-

	<b>C+D</b> n = 50 (%)	<b>A+B</b> n = 49 (%)	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>CC</b>	3 (6,00)	4 (8,16)	Referência	
<b>CT</b>	21 (42,00)	24 (48,98)	1,17 (0,27-4,73)	-
<b>TT</b>	26 (52,00)	21 (42,86)	1,65 (0,38-6,62)	-
<b>Alelo C</b>	27 (27,00)	32 (32,65)	Referência	
<b>Alelo T</b>	73 (73,00)	66 (67,35)	1,31 (0,72-2,39)	-

#### 4.2.3. Exon 01 do gene TGF- $\beta$ 1: +10T>C

O polimorfismo identificado com o rs1800470 é caracterizado pela alteração de uma citosina por uma timina no códon 10 do exon 01 do gene TGF- $\beta$ 1. Analisando as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo neste códon entre os pacientes portadores da doença e os indivíduos controle (Tabela 4.8) a fim de identificar a associação com a susceptibilidade com a doença de Chagas, identificamos importante aumento na frequência do genótipo CT ( $p < 0.008$ ) no grupo de pacientes portadores da doença (61,18%) em relação aos controles (44,8%). Além disso, também observamos um significativo aumento na frequência dos carreadores dos genótipos TT ( $p < 0.05$ ) no grupo de casos em

relação aos indivíduos controle. Desta forma, podemos sugerir que indivíduos com os genótipos CT e CC no codón 10 do gene TGF- $\beta$ 1 possuem, respectivamente, 4 (IC 95% = 1,49-11,03) e 3 (IC 95% = 1,05-9,36) vezes mais susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas.

Tabela 4.8: Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo no códon 10 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas.

	<b>Casos n = 152 (%)</b>	<b>Controle n = 29 (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>TT</b>	14 (9,21)	8 (27,59)	Referência	
<b>CT</b>	93 (61,18)	13 (44,83)	4,09 (1,49-11,03)	<b>0.005</b>
<b>CC</b>	45 (29,61)	8 (27,59)	3,21 (1,05-9,36)	<b>0.04</b>
<b>Alelo C</b>	121	29	Referência	
<b>Alelo T</b>	183	29	1,51 (0,87-2,63)	0.16

Em relação às análises do polimorfismo +10T>C associado aos diferentes estágios da forma cardíaca da doença (Tabela 4.9), não encontramos diferenças significativas entre a distribuição das frequências genótípicas e alélicas entre os grupos A+B e C+D e pacientes indeterminados. Desta forma, podemos considerar que o polimorfismo +10T>C não está associado com a progressão dos diferentes estágios clínicos da CCC.

Tabela 4.9: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo no códon 10 do gene TGF- $\beta$ 1 comparando pacientes A+B, C+D e os estágios indeterminado.

	<b>A+B</b> n = 49 (%)	<b>IND</b> n = 53 (%)	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>TT</b>	8 (16,33)	3 (5,66)	Referência	
<b>CT</b>	31 (63,27)	31 (58,49)	0,38 (0,11-1,47)	0.32
<b>CC</b>	10 (20,41)	19 (35,85)	0,20 (0,06-1,36)	0.32
<b>Alelo T</b>	47 (47,96)	37 (34,91)	Referência	
<b>Alelo C</b>	51 (52,04)	69 (65,09)	0,58 (0,34-1,02)	0.08
	<b>C+D</b> n = 50 (%)	<b>IND</b> n = 53 (%)	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>TT</b>	3 (6,00)	3 (5,66)	Referência	
<b>CT</b>	31 (92,00)	31 (58,49)	1,00 (0,23-4,35)	-
<b>CC</b>	16 (32,00)	19 (35,85)	0,84 (0,18-3,91)	-
<b>Alelo T</b>	37 (37,00)	37 (34,90)	Referência	
<b>Alelo C</b>	63 (63,00)	69 (65,10)	0,91 (0,52-1,60)	-
	<b>C+D</b> n = 50 (%)	<b>A+B</b> n = 49 (%)	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>TT</b>	3 (6,00)	8 (16,33)	Referência	
<b>CT</b>	31 (62,00)	31 (63,27)	2,67 (0,68-8,70)	0.32
<b>CC</b>	16 (32,00)	10 (20,41)	4,26 (0,94-15,49)	0.08
<b>Alelo T</b>	37 (37,00)	51 (50,00)	Referência	
<b>Alelo C</b>	63 (63,00)	51 (50,00)	1,70 (0,97-2,95)	0.08

#### 4.2.4. Exon 01 do gene TGF- $\beta$ 1: +25G>C

O polimorfismo identificado com o rs1800471, é caracterizado pela alteração de uma guanina por uma citosina no códon 25 do exon 01 do gene TGF- $\beta$ 1. Quando avaliamos a associação do polimorfismo no códon 25 ao desenvolvimento da doença e dos estágios da forma cardíaca entre os diferentes grupos (Tabela 4.10 e 4.11), não encontramos diferenças significativas entre a distribuição das frequências genotípicas e alélicas. Desta forma, podemos considerar que o polimorfismo +25G>C não está associado ao desenvolvimento dos estágios clínicos e à susceptibilidade à doença de Chagas.

Tabela 4.10: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo no códon 25 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas.

	<b>Casos n = 152 (%)</b>	<b>Controle n = 29 (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>GG</b>	131 (86.18)	27 (93.10)	Referência	
<b>CG</b>	20 (13.16)	2 (6.90)	2,06 (0,48-6,15)	-
<b>CC</b>	1 (0.66)	0 (0.00)	0,00 (0,05-7,16)	-
<b>Alelo C</b>	282	56	Referência	
<b>Alelo G</b>	22	2	0,42 (0,16-1,91)	0.31

Tabela 4.11: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo no códon 25 do gene TGF- $\beta$ 1 comparando pacientes A+B, C+D e os estágios indeterminado.

	<b>A+B n = 49 (%)</b>	<b>IND n = 53 (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>GG</b>	43 (87,76)	47 (88,68)	Referência	
<b>CG</b>	6 (12,24)	5 (9,43)	1,31 (0,40-4,14)	-
<b>CC</b>	0 (0,00)	1 (1,89)	0,00 (0,03-4,16)	-
<b>Alelo G</b>	92 (93,88)	99 (93,40)	Referência	
<b>Alelo C</b>	6 (6,12)	7 (6,60)	0,92 (0,33-2,67)	-
	<b>C+D n = 50 (%)</b>	<b>IND n = 53 (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>GG</b>	41 (82,00)	47 (88,68)	Referência	
<b>CG</b>	9 (18,00)	5 (9,43)	0,56 (0,52-3,64)	0.32
<b>CC</b>	0 (0,00)	1 (1,89)	0,00 (0,11-1,69)	0.32
<b>Alelo G</b>	91 (91,00)	99 (93,40)	Referência	
<b>Alelo C</b>	9 (09,00)	7 (6,60)	1,40 (0,52-3,64)	-
	<b>C+D n = 50 (%)</b>	<b>A+B n = 49 (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>CC</b>	41 (82,00)	43 (87,76)	Referência	
<b>CT</b>	9 (18,00)	6 (12,24)	1,57 (0,53-4,40)	-
<b>TT</b>	0 (0,00)	0 (0,00)	0,00 (0,06-17,30)	-
<b>Alelo G</b>	91 (91,00)	92 (93,88)	Referência	
<b>Alelo C</b>	9 (9,00)	6 (6,12)	1,52 (0,54-4,05)	-

#### 4.2.5. Exon 05 do gene TGF- $\beta$ 1: +263C>T

O polimorfismo registrado com o rs1800472 é caracterizado pela alteração de uma citosina por uma timina no códon 263 do exon 05 do gene TGF- $\beta$ 1. Analisando as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo nesta posição relacionando ao desenvolvimento da doença e à progressão aos estágios da forma cardíaca (Tabela 4.12 e 4.13), não identificamos aumento na distribuição da frequência dos genótipos e alelos. Assim, podemos afirmar que o polimorfismo +263C>T não está associado à susceptibilidade ao desenvolvimento da doença ou à sua progressão.

Tabela 4.12: Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo no códon 263 do gene TGF- $\beta$ 1 avaliando a associação com a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas.

	<b>Casos n = 152 (%)</b>	<b>Controle n = 29 (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>CC</b>	145 (95.39)	28 (96.55)	Referência	
<b>CT</b>	6 (3.95)	1 (3.45)	1,16 (0,17-4,29)	-
<b>TT</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0,01-3,22)	-
<b>Alelo T</b>	6	1	Referência	
<b>Alelo C</b>	296	57	0,87 (0,24-5,87)	-

Tabela 4.13: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo no códon 263 do exón 05 do gene TGF- $\beta$ 1 comparando pacientes A+B, C+D e os estágios indeterminado.

	<b>A+B</b> <b>n = 49 (%)</b>	<b>IND</b> <b>n = 53 (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>CC</b>	47 (95,92)	51 (96,23)	Referência	
<b>CT</b>	2 (4,08)	2 (3,77)	1,09 (0,21-5,63)	-
<b>TT</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0,07-17,82)	-
<b>Alelo C</b>	96 (97,96)	104 (98,11)	Referência	
<b>Alelo T</b>	2 (2,04)	2 (1,89)	1,08 (0,21-5,49)	-
	<b>C+D</b> <b>n = 50 (%)</b>	<b>IND</b> <b>n = 53 (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>CC</b>	48 (96,00)	51 (96,23)	Referência	
<b>CT</b>	2 (4,00)	2 (3,77)	1,06 (0,20-5,51)	-
<b>TT</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0,06-17,45)	-
<b>Alelo C</b>	98 (98,00)	104 (98,11)	Referência	
<b>Alelo T</b>	2 (2,00)	2 (1,89)	1,06 (0,06-15,47)	-
	<b>C+D</b> <b>n = 50 (%)</b>	<b>A+B</b> <b>n = 49 (%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>
<b>CC</b>	48 (96,00)	47 (95,92)	Referência	
<b>CT</b>	2 (4,00)	2 (4,08)	0,97 (0,19-5,09)	-
<b>TT</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0,06-16,11)	-
<b>Alelo C</b>	98 (98,00)	96 (97,96)	Referência	
<b>Alelo T</b>	2 (2,00)	2 (2,04)	0,98 (0,19-4,97)	-

### 4.3. Níveis de proteínas circulantes

#### 4.3.1. TGF- $\beta$ e BNP

O soro dos indivíduos que consentiram em participar do estudo (controle ou pacientes portadores da doença de Chagas) foi obtido para avaliação dos níveis séricos do TGF- $\beta$  e BNP através de ensaios de ELISA. Em relação ao TGF- $\beta$ , observamos níveis significativamente mais baixos do TGF- $\beta$  circulante nos pacientes C+D quando comparados com os indivíduos pacientes indeterminados (Figura 4.3A). Quando correlacionamos os níveis séricos em relação ao gênero e a idade dos pacientes (Figura 4.3B e C), não observamos significativas diferenças, indicando que os níveis do TGF- $\beta$  não são influenciados por estes parâmetros.

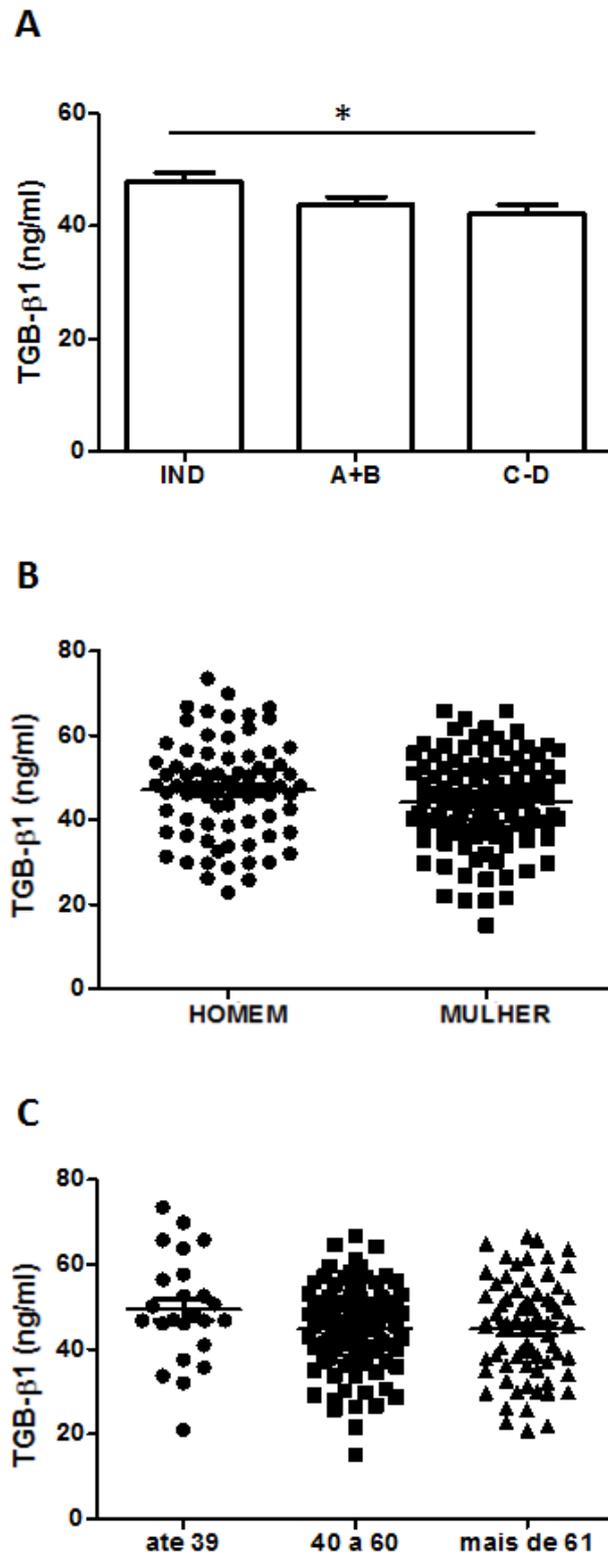


Figura 4.3: Análise dos níveis séricos do TGF-β em relação a classificação dos grupos do estudo (A), ao gênero (B) e a faixa etária dos pacientes (C). Asterisco indica diferença estatística entre os grupos, \* $p < 0,01$ .

As análises dos níveis de BNP circulante mostraram que esta molécula é altamente modulada com a evolução da forma cardíaca da doença de Chagas crônica (Figura 4.4A). Observamos que os pacientes crônicos com forma cardíaca da doença de Chagas, estágios A+B e C+D, apresentavam os níveis séricos do BNP significativamente aumentados (respectivamente,  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ ) quando comparado com pacientes de forma indeterminada. O grupo C+D, em média, apresentou cerca de 10 vezes mais BNP circulante do que pacientes indeterminados. Quando avaliamos os níveis desta molécula em relação ao gênero e a idade, observamos que o sexo não influencia nos níveis de BNP circulantes (Figura 4.4B). Já a análise comparando a faixa etária dos pacientes com os níveis séricos, identificamos que pacientes com mais de 40 anos possuem níveis significativamente ( $p < 0,001$ ) mais altos do que pacientes até 39 anos (Figura 4.4C).

#### **4.4. Análise dos polimorfismos com os níveis séricos de TGF- $\beta$**

Ao avaliar a associação dos níveis circulantes do TGF- $\beta$ 1 com os polimorfismos selecionados neste estudo, observamos uma associação significativa com o SNP na posição -509. A presença do alelo C nesta região do gene do TGF- $\beta$ 1, sendo heterozigoto (CT) ou homozigoto (CC), está correlacionado significativamente a níveis séricos mais baixos do TGF- $\beta$ 1 circulante quando comparado com indivíduos TT na posição -509. Não identificamos associação dos polimorfismos na posição -800, nos códons 10 e 25 e 263 com os níveis circulantes do TGF- $\beta$ 1 (Figura 4.5).

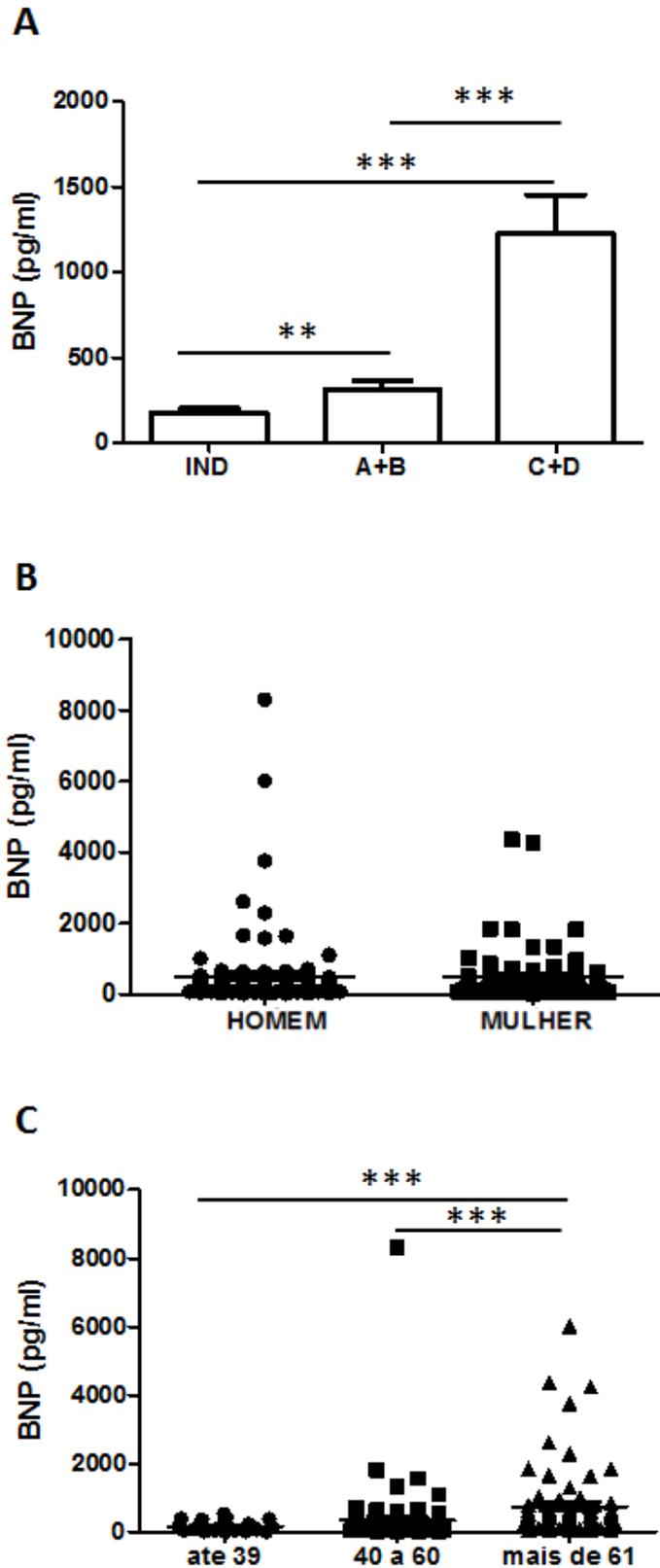


Figura 4.4: Análise dos níveis séricos do BNP em relação a classificação dos grupos do estudo (A), ao gênero (B) e a faixa etária dos pacientes (C). Asterisco indica diferença estatística entre os grupos, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$ .

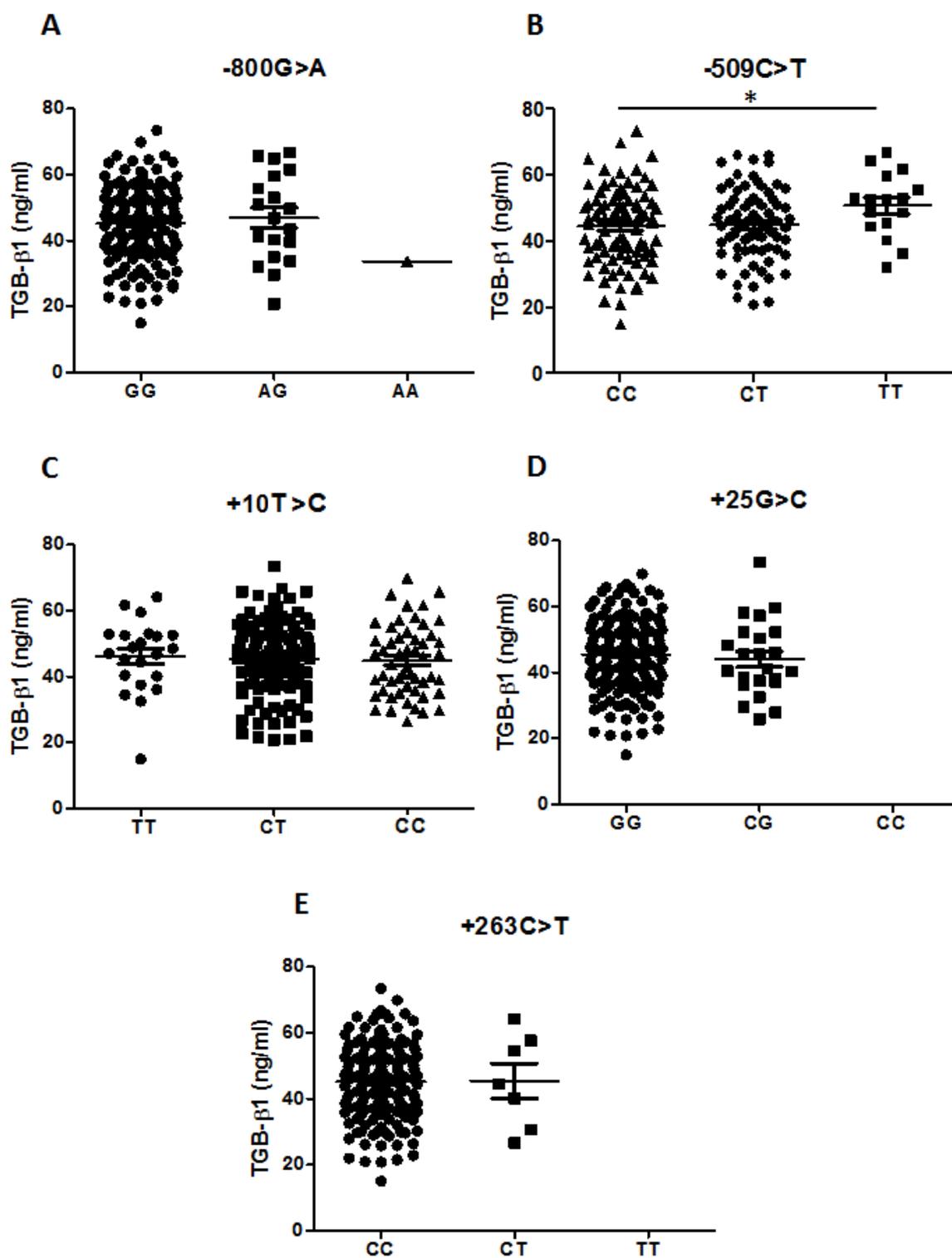


Figura 4.5: Associação dos polimorfismos do gene de TGF-β1 com os níveis séricos do TGF-β1: (A) posição -800, (B) posição -509, (C) códon 10 (D) códon 25 e (E) códon 263. Asterisco indica diferença estatística entre os grupos, \* $p < 0,03$ .

#### **4.5. Avaliação dos polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com os níveis séricos de BNP**

Também realizamos análises a fim de identificar se os níveis do BNP circulante no soro dos pacientes estão associados aos polimorfismos existentes no gene de TGF- $\beta$ 1. Dessa forma, identificamos que os polimorfismos da região promotora (-800G>A e -509T>C), dos códons 10 e 263 do gene de TGF- $\beta$ 1 não estão associados aos níveis do BNP no soro dos pacientes analisados. Porém, em relação ao códon 25 nós observamos uma significativa ( $p<0,02$ ) correlação com este polimorfismo. A presença do alelo C no códon 25 no gene de TGF- $\beta$ 1 apresentou uma interessante associação com níveis séricos mais baixos do BNP (Figura 4.6).

#### **4.6. Avaliação dos polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com a fração de ejeção ventricular**

Em relação às análises associando os polimorfismos estudados com os valores da fração de ejeção ventricular obtidos durante o atendimento clínico no INI nós não observamos qualquer relação entre eles (Figura 4.7).

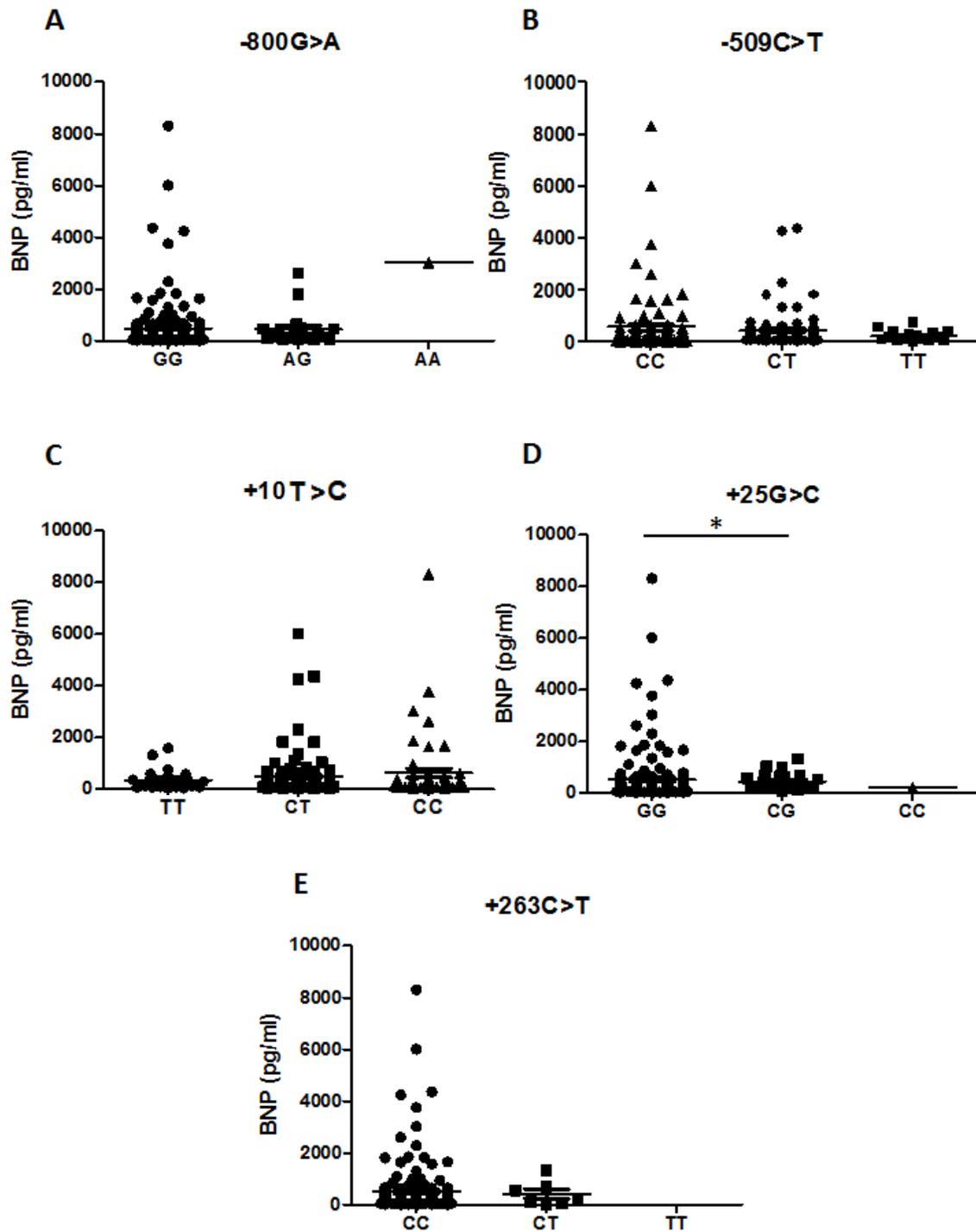


Figura 4.6: Associação dos polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com os níveis séricos do BNP: (A) posição -800, (B) posição -509, (C) codón 10 (D) códon 25 e (E) códon 263. Asterisco indica diferença estatística entre os grupos, \* $p < 0,02$ .

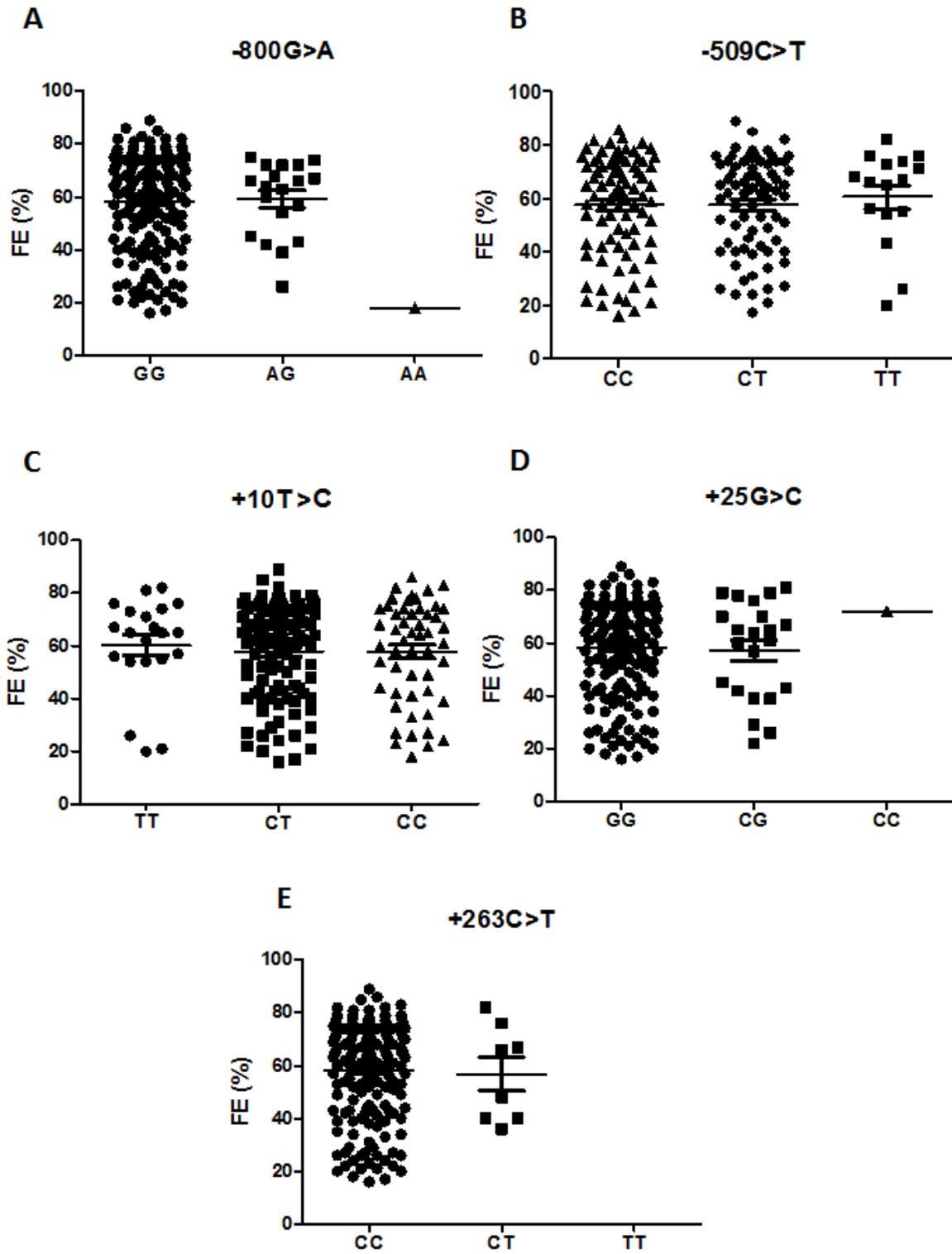


Figura 4.7: Associação dos polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 com a fração de ejeção ventricular: (A) posição -800, (B) posição -509, (C) codón 10 (D) códon 25 e (E) códon 263.

#### 4.7. Avaliação da fração de ejeção ventricular com os níveis de TGF- $\beta$ 1 e BNP

Identificamos que o grupo de pacientes que possui FE menor de 35% apresentam níveis séricos do BNP significativamente mais altos (~2000pg/ml) quando comparados com pacientes com FE maior que 35% (Figura 4.8A). Já em relação ao TGF- $\beta$ 1, não observamos diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 4.8B).

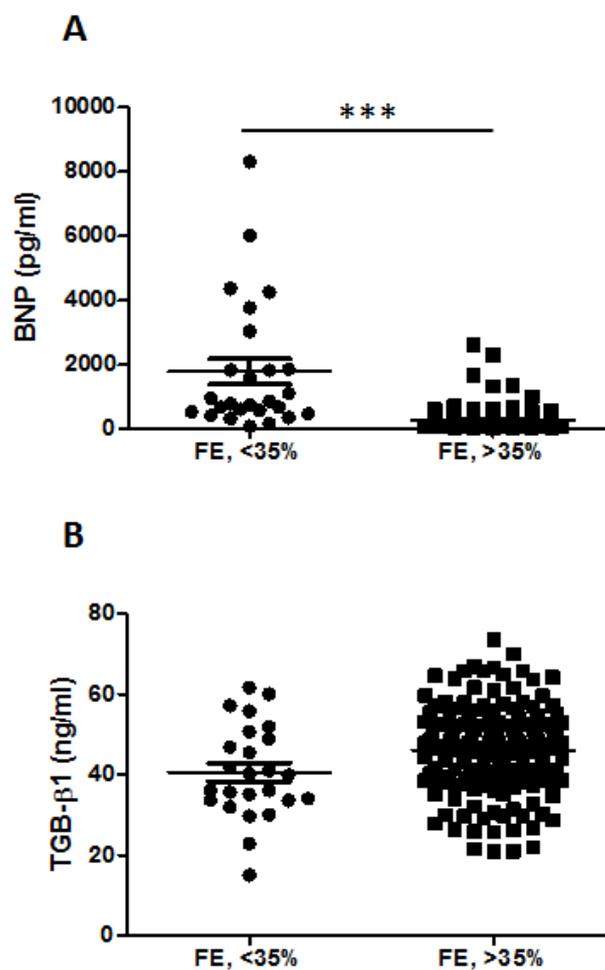


Figura 4.8: Análise comparativa dos níveis circulantes de BNP (A) e TGF- $\beta$ 1 (B) com a fração de ejeção ventricular de todos os pacientes analisados, com corte em 35% de FE, média encontrada nos estágios mais avançados da CCC. Asterisco indica diferença estatística entre os grupos, \* $p < 0,0001$ .

## 5. DISCUSSÃO

A doença de Chagas, causada pelo parasita *T. cruzi*, é um grande problema econômico e de saúde pública na maioria dos países latino-americanos (Rassi Jr. e cols., 2009), por ser uma das principais causas de IC e apresentar alta taxa de morbidade e mortalidade (Parra e cols., 2008; Henao-Martínez e cols., 2012). Esse fato tem motivado o desenvolvimento de diversos estudos envolvendo fatores prognósticos de risco de evolução da doença e de morte. Após anos de pesquisa, evidências apontam a influência de fatores genéticos do hospedeiro sobre a evolução clínica da doença de Chagas, uma vez que pacientes cronicamente infectados podem progredir para a forma determinada enquanto que outros se mantêm na forma indeterminada. Assim, o reconhecimento da associação entre os polimorfismos de genes específicos do hospedeiro, que são descritos por influenciarem diretamente na infecção pelo *T. cruzi* e no desenvolvimento da doença, como, por exemplo: o TGF- $\beta$ 1, poderia contribuir para o mapeamento de genes de susceptibilidade ou resistência à doença de Chagas.

Na etapa inicial do estudo, em que foi realizado o recrutamento da população de pesquisa, identificamos que os pacientes compõem uma interessante coorte mista, com indivíduos naturais de todas as regiões do Brasil. Este fato é importante para um estudo, no Brasil, envolvendo polimorfismos genéticos. Além disso, identificamos um número maior de pacientes oriundos das regiões nordeste e sudeste. Segundo a Sociedade Brasileira de Infectologia (2014), as regiões originalmente de risco para a transmissão vetorial são representadas pelos estados: AL, BA, CE, PB, PE, RN, PI, SE, MA (Nordeste); DF, GO, MS, MT, TO (Centro-oeste); MG e SP (Sudeste); PR e RS (Sul). No presente trabalho, acreditamos que a distribuição da transmissão vetorial contribua com o aumento de indivíduos infectados naturais das regiões nordeste e sudeste.

Em nosso estudo, observamos um maior número de pacientes do gênero feminino (58%). Outro trabalho, envolvendo pacientes com CCC e

polimorfismos no gene de IL-10, também apresentou maior predominância deste gênero (~55%) (Costa e cols., 2009). De acordo com Costa-Junior e Maia (2009) homens e mulheres têm igualmente possibilidades em desenvolver doenças. Porém as mulheres realizam acompanhamento médico mais frequente resultando no aumento da procura ao sistema de saúde. A diferença na distribuição do gênero talvez possa ser explicada por este fato. Da mesma forma, o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas pode ter maior frequência de atendimento à mulheres portadoras da doença de Chagas, uma vez que outros trabalhos envolvendo pacientes provenientes desse instituto também apresentam participação majoritária do gênero feminino (Araujo-Jorge e cols., 2002; Lapa e cols., 2012;). Em relação à faixa etária observamos que pacientes da forma indeterminada possuem idade média de 52 anos, enquanto que pacientes com forma cardíaca apresentam, em média, idade superior a 58 anos. Costa e cols. (2009) também identificaram um aumento da idade de acordo com a evolução da CCC, pacientes em estágios mais avançados apresentavam aproximadamente 6 anos a mais do que os pacientes da forma indeterminada. Este fato pode está correlacionado com o tempo de infecção e provavelmente com a suscetibilidade de indivíduos mais idosos em desenvolver os sintomas clínicos mais graves da doença.

Alterações eletrocardiográficas em indivíduos com sorologia positiva para a doença de Chagas precedem ao aparecimento de outros sintomas, como anormalidades ao exame físico e ao estudo radiológico do tórax (Marques e col., 2006). Devido a fácil execução e ao baixo custo, o ECG é o exame mais difundido e executado na prática clínica (Almeida, 2004). O ecocardiograma, segundo o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (2005), é o exame de eleição para avaliação da função miocárdica e do estadiamento da CCC por ser um método não invasivo, reprodutível e de grande acurácia.

Um trabalho visando identificar a função diastólica atrial e ventricular esquerda na doença de Chagas crônica, analisou as manifestações eletrocardiográficas em pacientes nos diferentes estágios clínicos da CCC (Nascimento e cols., 2013). Foi observado que 4% dos 69 pacientes na forma indeterminada apresentavam hemibloqueio anterior esquerdo. Em nosso

estudo, também identificamos esta mesma proporção: dos 53 pacientes 3,8% apresentavam esta alteração. O hemibloqueio anterior esquerdo não é classificador da forma cardíaca, como é o caso da APRV e do BRD. Em relação a estes parâmetros, 34,7% do grupo A+B e 46% do grupo C+D apresentam APRV enquanto que 46,9% do grupo A+B e 46% do grupo C+D possuem BRD. Dados da literatura confirmam que essas alterações são características dos grupos mais avançados da CCC. Nascimento e cols. (2013) avaliaram estes parâmetros e identificaram que 52% do grupo A+B e 42,3% do grupo C+D apresentam APRV e 68% do grupo A+B e 73% do grupo C+D possuem BRD. Este fato reforça a boa classificação da coorte de estudo realizada pela equipe do INI, coordenada pelo pesquisador Roberto Saraiva.

As análises de acometimento cardíaco, realizadas por ecocardiograma, aumentaram a quantidade e qualidade das informações para a investigação da doença de Chagas, tanto funcionais como anatômicas. Tendo em vista isto, tornou-se um dos exames complementares mais importantes na clínica dos pacientes portadores da doença. Através do ECO é possível identificar dilatação de cavidades (do VE, podendo ainda reconhecer o comprometimento do AE e das cavidades direitas), trombos e disfunção diastólica e sistólica do VE (revisto por Pereira, 2011).

Desta forma, os pacientes dos estágios C+D apresentaram aumento no diâmetro cavitário do AE e do VE cerca de 8mm, e queda da FE do VE, sendo aproximadamente 50% menor nos pacientes nos estágios mais graves da forma cardíaca do que nos indivíduos controle e indeterminados. Estudos mostram que pacientes cardiopatas crônicos apresentam, em média, aumento de 5 a 10mm do diâmetro do AE e redução de 30% da FE quando comparados com indivíduos sadios (Silva e cols., 2005; Pazin-Filho e cols, 2007; Nascimento e cols., 2013). Essas modificações estruturais e funcionais já são bem caracterizadas e utilizadas na clínica médica, uma vez que a fração de ejeção é requisito para a caracterização dos estágios da forma cardíaca.

Os mecanismos responsáveis pela susceptibilidade à infecção que estão envolvidos no desenvolvimento na doença de Chagas crônica ainda não são

bem compreendidos. No entanto, há questionamentos crescentes de que as diferenças de suscetibilidade em áreas endêmicas podem ser atribuídas a fatores genéticos. Estudos anteriores buscando associação de polimorfismos genéticos de citocinas com a evolução da doença de Chagas já foram realizados (revisto por Vasconcelos e cols., 2012). Na população mexicana, o polimorfismo IL-1 RN teve associação à suscetibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas enquanto que o SNP na posição -308 do gene de TNF- $\alpha$  foi associado à cardiopatia (Rodríguez-Pérez, 2005; Cruz-Robles e cols, 2009).

Os polimorfismos genéticos do gene TGF- $\beta$ 1 também têm sido associados à gravidade e suscetibilidade ao desenvolvimento de várias doenças, tais como: câncer de boca (Cai e cols., 2013), fibrose pulmonar (Son e cols., 2013), doença crônica renal (Nabrdalik e cols., 2013) entre outras. Na doença de Chagas, a suscetibilidade ao desenvolvimento associada a polimorfismos do gene TGF- $\beta$ 1, já foi avaliada. Calzada e cols. (2009) estudaram cinco polimorfismos já descritos com significado funcional conhecido: posições -988, -800, -509, códon 10 e posição +263. Foram analisados os genótipos de pacientes portadores da doença e indivíduos controle dos países Colômbia e Peru. Neste trabalho foi identificado que a frequência do genótipo CC no códon 10 do gene TGF- $\beta$ 1 era maior no grupo de pacientes de ambas as populações. Sugerindo, pela primeira vez, que este polimorfismo possa estar envolvido na suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi* nestes pacientes.

Mais de dez diferentes SNP já foram descritos, tanto para a região promotora quanto para a região codificante no gene de TGF- $\beta$ 1 (Watanabe e cols., 2002). Dentre esses, selecionamos 5: na região promotora (posições -509 e -800), no exon 01 (códon 10 e 25) e exon 05 (posição +263). Dentro da avaliação genética dos polimorfismos no gene de TGF- $\beta$ 1 estudados e a correlação com a suscetibilidade ao desenvolvimento e evolução da doença de Chagas, os nossos achados mais importantes referem-se ao SNP da região promotora do gene TGF- $\beta$ 1 na posição -509, onde há a troca de citosina por uma timina. Avaliando o teste de homogeneidade genotípica entre

amostras, observamos um efeito significativo de susceptibilidade, cerca de 3 vezes para o genótipo TT e 4,5 vezes para o genótipo CT na posição -509 em desenvolver a doença de Chagas. Curiosamente, quando analisamos a homogeneidade alélica entre as amostras nós não observamos diferença significativa. Acreditamos que os pacientes heterozigotos nesta posição tiveram importante participação na análise, tornando o alelo C homogêneo em relação ao alelo T, dentro da nossa população de estudo.

O polimorfismo na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1 não havia sido estudado previamente na literatura e associado com a susceptibilidade à infecção e evolução clínica da doença de Chagas. Mas, em outras doenças cardíacas e fibróticas, já foi observada a sua associação. Um trabalho interessante desenvolvido por Najari e cols. (2011) analisou a frequência alélica na posição -509 do gene TGF- $\beta$  em pacientes com infarto agudo do miocárdio em uma população do Irã. Foi observada que a presença do alelo T na posição -509 era mais frequente em pacientes com infarto agudo (18,3%) do que no grupo controle (11,7%). Choi e cols. (2014) avaliaram a frequência genotípica na posição -509 em pacientes portadores de câncer gástrico na Coreia. Foi observado que o genótipo TC na posição -509 está associado a maior risco de desenvolver câncer gástrico (OR = 1,35 /  $p < 0.01$ ). Outro trabalho também avaliou a presença deste polimorfismo na região promotora do gene TGF- $\beta$  em pacientes portadores de infecção por hepatite C no Egito. Foi identificado que a presença do alelo T na posição -509 foi significativamente maior em pacientes com hepatite C (44,5% /  $p < 0.001$ ) do que nos indivíduos controles (Pasha e cols., 2013).

Desta forma, é possível identificar a importância do polimorfismo na posição -509 do TGF- $\beta$ 1 com a susceptibilidade ao desenvolvimento das doenças que envolvem diretamente a participação desta molécula. No entanto, alguns estudos desenvolvidos não observaram qualquer associação entre a presença do polimorfismo na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1 com o desenvolvimento de algumas doenças, tais como: infecções cervicais profundas na Sérvia, obesidade em crianças na Turquia, câncer no pâncreas

na Alemanha e endometriose na Coreia do Sul (Jevtović-Stoimenov e cols., 2013; Kanra e cols. 2011, Wu e cols., 2010; Kim e cols., 2010).

Este SNP também pode influenciar os níveis de expressão, aumentando a secreção do TGF- $\beta$  (Grainger e cols., 1999 Yao e cols., 2005; Najar cols., 2011). Tendo em vista que o polimorfismo -509 está localizado em uma importante região reguladora, é possível sugerir que a troca C>T altere a regulação do gene de TGF- $\beta$  e explique alguns relatos de superexpressão do TGF- $\beta$ 1 (Luedeking, 2000). Além disto, o alelo T pode afetar a ligação do fator de transcrição YY1, o que resulta no aumento a transcrição do gene de TGF- $\beta$ 1 (Hobbs, 1998).

A maior transcrição gênica parece estar acompanhada com maiores níveis circulantes de TGF- $\beta$ 1: dados da literatura demonstram que os níveis de TGF- $\beta$ 1 estão aumentados em indivíduos carreadores do alelo T comparados aos níveis circulantes de TGF- $\beta$  de indivíduos carreadores do alelo C (Grainger e cols., 1999; Yao e cols., 2005; Najar cols., 2011). Nossos dados corroboram os dados da literatura, observamos que indivíduos que possuem o alelo T na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1 possuem níveis significativamente mais altos, homocigotos (52,5+-9,8) e heterocigotos (44,0+-10,8), quando comparados a indivíduos com genótipo CC (40,6+-11,6). Para os demais polimorfismos, não identificamos diferenças significativas entre a secreção do TGF- $\beta$ 1 e os diferentes genótipos analisados.

Além disso, através de achados imunohistoquímicos, foi demonstrado que indivíduos carreadores do alelo T na posição -509, podem apresentar aumento da expressão do TGF- $\beta$ 1 no centro dos tecidos cancerígenos quando comparados com amostras de indivíduos com o genótipo CC. Este fenótipo era acompanhado por níveis mais altos de mRNA do TGF- $\beta$ 1 em células gástricas de indivíduos carreados com alelo T na posição -509 (Choi e cols.,2014).

Trabalhos anteriores do grupo e outros demonstraram uma direta participação do TGF- $\beta$  na infecção pelo *T. cruzi*: (i) *T. cruzi* necessita dos

receptores T $\beta$ RI e T $\beta$ RII ativos para infectar células hospedeiras, indicando uma dependência da via de sinalização do TGF- $\beta$  (Ming e cols., 1995); (ii) a utilização de anticorpo anti-TGF- $\beta$  inibe a infecção de cardiomiócitos pelo *T. cruzi*, sugerindo assim que o TGF- $\beta$  e sua ativação são necessários para a internalização do parasito nas células de mamíferos (Waghabi e cols., 2005a) e (iii) a inibição da via de TGF- $\beta$  é capaz de diminuir a invasão dos cardiomiócitos pelo *T. cruzi*, reduzindo o número de parasitas por células infectadas e a diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas ao final do ciclo (Waghabi e cols., 2007).

Podemos, então, sugerir um mecanismo para entender como pacientes carreadores dos genótipos CT e TT podem ser mais susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*. Acreditamos que indivíduos carreadores do alelo C na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1, que afeta negativamente a transcrição gênica, podem apresentar menor expressão e secreção desta molécula. Ao ser infectado pelo *T. cruzi*, os baixos níveis do TGF- $\beta$ 1 expressos podem influenciar na internalização do parasito, dificultando a entrada do *T. cruzi* nas células do hospedeiro vertebrado. Este processo pode favorecer ao surgimento de uma resposta imune mais eficaz, protegendo o indivíduo. Desta forma, carreadores do alelo C na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1 podem ter um fator genético de proteção, enquanto os carreadores do alelo T podem ter maior susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (Figura 5.1).

No presente estudo, analisamos ainda outros quatro polimorfismos presentes no gene TGF- $\beta$ 1. Ao realizar os testes de homogeneidade genotípica para o polimorfismo no códon 10, nós identificamos outra associação de susceptibilidade e proteção. Este polimorfismo consiste na troca de uma citosina por uma timina na posição +869 do codón 10. Observamos um efeito significativo de 3 vezes mais susceptibilidade à infecção para o genótipo TT e 4 vezes para o genótipo CT. Já em relação a correlação com os estágios da doença, não identificamos qualquer associação com a progressão da doença.

Em relação aos polimorfismos -800 e +263, Calzada e cols. (2009) encontraram uma frequência muito baixa destes SNP. Para o polimorfismo -800, de todos os pacientes apenas 9 eram carreadores do alelo A em homozigose e 6 em heterozigose (AG). Nós observamos uma frequência superior, mas não significativa, de indivíduos com os genótipos AG e AA, um total de 20 pacientes na posição -800 do gene de TGF- $\beta$ 1. No presente estudo, também não identificamos associação desses polimorfismos tanto com a proteção ou susceptibilidade, quanto com os estágios evolutivos da doença de Chagas.

No estudo anterior de Calzada e cols. o polimorfismo na posição +263 foi considerado como raro, uma vez que na sua população de estudo (Bolívia e Peru) não encontraram nenhum paciente que fosse carreador do alelo mutado (T). Este SNP está localizado próximo ao sítio de clivagem do peptídeo associado à latência (LAP), podendo estar envolvido nos processos de ativação do TGF- $\beta$ 1 (Koch e cols, 2006). Como descrito na seção de Introdução, a atividade do TGF- $\beta$ 1 é finamente regulada e desta forma, acreditamos que o comprometimento do processo de ativação do TGF- $\beta$ 1 possa impedir o reconhecimento pelos seus receptores de superfície, inibindo o desempenho de suas funções biológicas. No presente trabalho, surpreendentemente, identificamos 7 pacientes em heterozigose nesta posição. Avaliando os níveis séricos médios de TGF- $\beta$  destes indivíduos (44,42ng/ml) identificamos que eles não diferem do restante da população (45,38ng/ml). Porém os níveis séricos analisados são relacionados aos níveis totais do TGF- $\beta$ 1 circulante e não em relação ao TGF- $\beta$ 1 ativo. Desta forma, seria interessante realizar a dosagem do TGF- $\beta$ 1 ativo nestas amostras para identificar se estes pacientes que possuem o polimorfismo na posição +263 apresentam diferentes níveis circulantes desta molécula ativa.

Outra estratégia que adotamos foi analisar o polimorfismo na posição +915 do códon 25 do gene de TGF- $\beta$ 1, que resulta na troca de uma guanina por uma citosina, uma vez que este SNP altera a estrutura primária da proteína reduzindo a polaridade do peptídeo (Perrey e cols., 1998). Dessa forma, podem

influenciar no processo de secreção do TGF- $\beta$ 1 (Susianti e cols., 2014). Na China, pacientes com hipertrofia do VE possuem índice de massa aumentada quando são carreadores do alelo G quando comparados com pacientes que possuem o alelo C nesta posição do códon 25 (Ying Xu e cols., 2010). Na Grécia, pacientes com miocardiopatia dilatada idiopática que são carreadores do alelo C nesta posição do códon 25 tem 4,2 vezes mais chances de desenvolver o pior grau da doença do que indivíduos não carreadores (Adamopoulos e cols., 2011). Porém, nós não observamos qualquer associação entre o polimorfismo do códon 25 com a susceptibilidade ao desenvolvimento e evolução da doença de Chagas.

Um estudo utilizando primatas infectados pelo *T. cruzi* demonstrou que o TGF- $\beta$  é produzido já na primeira semana da fase aguda e é constantemente expresso durante a fase crônica da doença de Chagas (Samudio e cols., 1999). Araújo-Jorge e cols. (2002) também demonstraram diferença importante entre os níveis circulantes desta citocina: pacientes portadores da doença de Chagas crônica têm níveis mais elevados (em média de 10-20 vezes) do TGF- $\beta$ 1 quando comparados com indivíduos saudáveis. Este dado foi corroborado no estudo de Pérez e cols. (2011), no qual os níveis séricos de TGF- $\beta$ 1 também aumentavam com a evolução da forma cardíaca crônica. Indivíduos controle e pacientes indeterminados não apresentavam diferença entre os níveis circulantes, enquanto que os pacientes dos estágios mais avançados da forma cardíaca apresentavam 2 vezes mais TGF- $\beta$ 1 circulante quando comparados com indivíduos controle. No nosso estudo, identificamos que 80% do grupo controle apresentava algum tipo de acometimento cardíaco podendo, portanto, influenciar o aumento dos níveis circulantes do TGF- $\beta$ 1. Dessa forma, não utilizamos este grupo de indivíduos para as análises dos níveis séricos do TGF- $\beta$ 1. Ao contrário de Araujo-Jorge e cols. (2002) e Perez e cols. (2011), nós observamos que os níveis do TGF- $\beta$ 1 foram significativamente menores em pacientes C+D do que em pacientes com forma indeterminada.

A fim de entender quais mecanismos poderiam estar ligados a este resultado, avaliamos quais os possíveis medicamentos que os pacientes nos

estágios A+B e C+D fazem uso. De acordo com a Diretriz latino-americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica (2011) e o Consenso para Doença de Chagas (2005) pacientes nos estágios C e D devem ser tratados com medicamentos indicados para IC. Além disso, pacientes nos estágios B com disfunção global também devem ser tratados. Estes medicamentos incluem substâncias, tais como: inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA), espirolactona e carvedilol. De acordo com os dados dos prontuários, identificamos 40% do grupo A+B e 82% do grupo C+D usam algumas dessas drogas. Segundo a literatura, IECA, espirolactona e carvedilol são compostos que modulam a expressão do TGF- $\beta$ 1 circulante.

Os IECA podem ser utilizados como uma potente droga anti-hipertensiva e seu uso vem sendo sugerido como opção terapêutica no tratamento de doenças musculares progressivas, pela inibição do TGF- $\beta$  (revisto por Silva 2009). Estudos experimentais também demonstraram que camundongos hipertensos tratados com IECA, resultou na menor expressão do mRNA para o gene TGF- $\beta$ 1 quando comparado com os camundongos não tratados (Kim e cols., 1996). A espirolactona, antagonista do receptor de aldosterona, pode reduzir de forma eficaz o aparecimento de fibrose atrial e fibrilação em modelo animal (revisto por Zhang e cols., 2014). O grupo observou que pacientes com doença renal crônica medicados com espirolactona durante 6 meses apresentavam níveis reduzidos do TGF- $\beta$ 1 na urina (Guney e cols., 2009). O carvedilol é um bloqueador vasodilatador-beta com ação antioxidante que vem sendo usado com muito sucesso em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (Paker, 1996). Ratos tratados com carvedilol apresentaram menor expressão de mRNA para TGF- $\beta$ 1 no rim (Wong e cols, 2001). Sendo assim, acreditamos que estes medicamentos possam ter influenciado na dosagem do TGF- $\beta$  circulante, fazendo com que houvesse níveis significativamente mais baixos nos grupos C+D quando comparados com pacientes indeterminados.

Há alguns anos, a dosagem do BNP vem sendo utilizada como diagnóstico no acompanhamento da descompensação cardíaca, especialmente nos casos de IC (Perreira-Barreto e cols, 2013). Os níveis de BNP também

estão correlacionados com a função diastólica. Quanto maior os níveis séricos do BNP maior também é o comprometimento da função sistólica em pacientes portadores da doença de Chagas (Garcia-Alvarez e cols, 2010). Em indivíduos com insuficiência ventricular esquerda, as concentrações séricas e plasmáticas do BNP também aumentam (Melo e cols., 2005). Heringer-Walther e cols. (2005) identificaram que os níveis séricos de BNP são significativamente mais altos nos pacientes com doença de Chagas das classes NYHA III-IV quando comparados com pacientes controles. Sendo então o BNP um importante marcador do dano cardíaco, fizemos as dosagens para identificar os níveis séricos dos pacientes dos diferentes grupos.

Assim como Garcia-Alvez (2010), nós também observamos aumento dos níveis circulantes do BNP entre os pacientes nos estágios mais avançados da forma cardíaca. Pacientes A+B apresentaram níveis séricos aumentados aproximadamente 2 vezes maior quando comparados com pacientes da forma indeterminada. Já no grupo dos pacientes C+D, os níveis circulantes do BNP aumentaram 12 vezes mais comparando aos pacientes indeterminados. Demonstrando mais uma vez a importância desta molécula como marcador de gravidade da doença de Chagas. Avaliamos se os níveis do BNP estavam correlacionados com os níveis do TGF- $\beta$ 1 e observamos que não houve qualquer relação entre os níveis dessas moléculas.

Como em outras formas de IC, a gravidade e mortalidade da doença aumenta à medida que se há o aumento do comprometimento da função miocárdica na doença de Chagas. Sendo assim, a fração de ejeção do VE tem demonstrado relação com sobrevida em pacientes com doença de Chagas (Mady e cols., 1994), ou seja, quanto menor a fração de ejeção maior a mortalidade. Em 2005, Mady e cols. observaram que existe uma associação entre a classe funcional e a fração de ejeção em pacientes com CCC, sugerindo que esta correlação pode ser útil para o acompanhamento da IC, características dos estágios C+D.

Desta forma, analisamos se os polimorfismos do gene de TGF- $\beta$ 1 estavam associados aos valores de fração de ejeção. Não encontramos

qualquer associação entre os SNP analisados com a fração de ejeção. Na literatura, até o momento, também não encontramos nenhum estudo comparando os polimorfismos do gene TGF- $\beta$ 1 com a fração de ejeção. Mas Wu e cols. (2014) avaliaram a presença de polimorfismos no gene do BNP com a diminuição da fração de ejeção em pacientes com doença coronariana (China). Porém, não encontraram nenhuma diferença significativa nas frequências alélicas e genóticas nos grupos estudados com fração de ejeção reduzida e preservada. He e cols. (2014) também avaliaram a associação da fração de ejeção com outros polimorfismos do gene da adenosina desaminase em pacientes com IC crônica na China. Assim como no nosso estudo, também não foi identificado nenhuma associação com os polimorfismos avaliados.

No presente estudo, identificamos que o grupo de pacientes que possui FE menor que 35% expressaram níveis séricos de BNP significativamente aumentados quando comparados com pacientes com FE maior que 35%. Assim como nós, os dados da literatura demonstram que a fração de ejeção ventricular é um fator determinante na avaliação dos níveis circulantes do BNP (Minai e cols., 2014). No entanto, identificamos que o comprometimento da fração de ejeção não teve correlação com os níveis do TGF- $\beta$ 1 circulante. Diferente dos nossos dados, Ye e cols. (2013) observaram que pacientes com fibrilação atrial (NYHA III) com fração de ejeção menor que 50% apresentaram mRNA para TGF- $\beta$ 1 aumentados quando comparados a pacientes com fração de ejeção superior a 50%. Sendo assim, seria importante propor estudos com pacientes de forma cardíaca grave que ainda não utilizam medicamentos que interfiram na expressão do TGF- $\beta$ 1, correlacionando o nível circulante do TGF- $\beta$ 1 com a alteração na fração de ejeção.

Nosso estudo possui algumas limitações. Os pacientes controle apresentam algum tipo de manifestação cardíaca que pode provavelmente aumentar os níveis circulantes do TGF- $\beta$ 1 e os pacientes dos estágios mais avançados da doença de Chagas são acompanhados com tratamento que podem modular a expressão do TGF- $\beta$ 1. Analisamos alguns polimorfismos que são frequentemente encontrados na população estudada. Portanto, é

importante que estes dados sejam validados em outras populações endêmicas com diferente histórico genético e característica epidemiológica.

Com este estudo validamos a importância da associação do polimorfismo no códon 10 com a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* na coorte estudada. Além disso, observamos outra associação do polimorfismo na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1 também com a susceptibilidade à infecção. Porém, não identificamos diferença na frequência alélica dos polimorfismos do gene do TGF- $\beta$ 1 entre os pacientes da forma indeterminada e os pacientes da forma cardíaca. Desta forma, os polimorfismos na posição -509 e no códon +10 do gene TGF- $\beta$ 1 podem ser considerados um fator de risco importante para a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*.

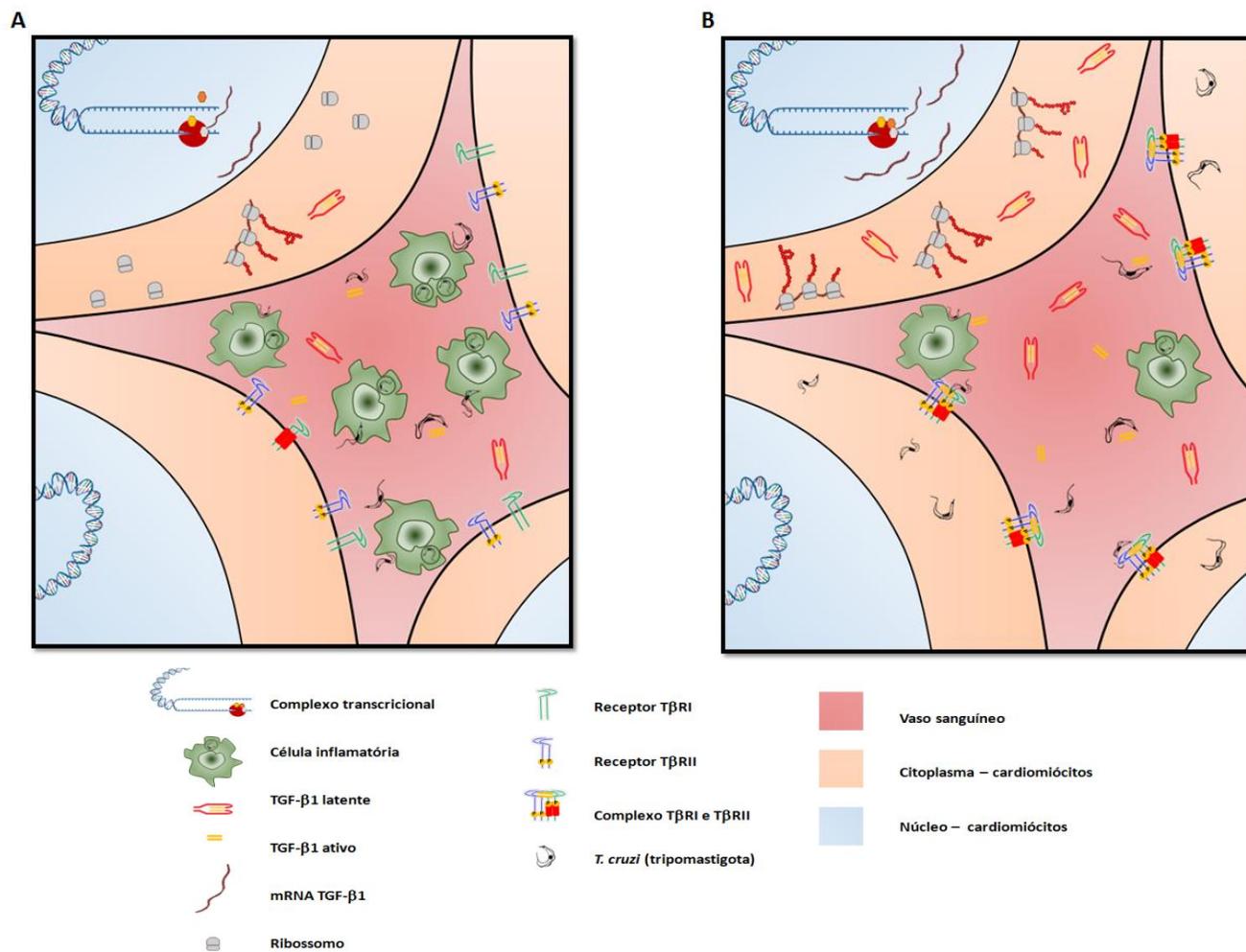


Figura 5.1: Esquema do possível mecanismo envolvendo o polimorfismo na posição -509 do gene TGF-β1. (A) Transcrição gênica em indivíduos carreadores do alelo C na posição -509, que afeta a ligação de fatores de transcrição, diminuindo a transcrição e consequente secreção do TGF-β1 favorecendo a resposta inflamatória. (B) Transcrição gênica em indivíduos carreadores do alelo T na posição -509, favorecendo a ligação de fatores de transcrição, aumentando a transcrição e consequente secreção do TGF-β1 favorecendo a infecção pelo *T. cruzi*.

## 6. CONCLUSÕES

Indivíduos carreadores dos genótipos CT e TT na posição -509 do gene TGF- $\beta$ 1 apresentam risco, respectivamente, 4,53 e 3,17 vezes maior em desenvolver a doença de Chagas, do que indivíduos carreadores do genótipo CC.

Indivíduos carreadores dos genótipos CT e CC no códon 10 do gene TGF- $\beta$ 1 possuem, respectivamente, 4 e 3 vezes mais risco em desenvolver a doença de Chagas, do que indivíduos carreadores do genótipo TT.

A presença do alelo T na região -509 do gene TGF- $\beta$ 1, está correlacionada significativamente a níveis séricos mais altos do TGF- $\beta$ 1.

Os polimorfismos -800 G>A, -509C>T, +10T>C, +25G>C e +263C>T do gene TGF- $\beta$ 1 não estão associados a progressão para a forma cardíaca da doença de Chagas;

Os polimorfismos -800 G>A, +25G>C e +263C>T do gene TGF- $\beta$ 1 não estão associados à susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Chagas;

Os níveis séricos do BNP aumentam conforme a evolução da forma cardíaca da doença de Chagas crônica, enquanto os níveis circulantes do TGF- $\beta$ 1 não aumentam conforme a evolução clínica;

Não há correlação entre os níveis circulantes do TGF- $\beta$ 1 e o marcador de gravidade de acometimento cardíaco, BNP;

Há correlação entre o polimorfismo no códon 25 do gene TGF- $\beta$ 1 com os níveis séricos aumentados do BNP;

Não há correlação entre os padrões de frequência dos alelos do gene do TGF- $\beta$ 1 com a FE e;

Pacientes com fração de ejeção menor que 35% expressam níveis séricos de BNP significativamente aumentados.

## 7. REFERÊNCIAS

Adamopoulos S, Kolokathis F, Gkouziouta A, Georgiadou P, Chaidaroglou A, Karavolias GK, Degiannis D, Voudris V, Kremastinos DT. Cytokine gene polymorphisms are associated with markers of disease severity and prognosis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cytokine*. 2011 54(1):68-73.

Amani D, Zolghadri J, Dehaghani AS, Pezeshki AM, Ghaderi A. The promoter region (-800, -509) polymorphisms of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) gene and recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol*. 2004 62(1-2):159-66.

Amirghofran Z, Jalali SA, Ghaderi A, Hosseini SV. Genetic polymorphism in the transforming growth factor beta1 gene (-509 C/T and -800 G/A) and colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009 1;190(1):21-5.

Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:71-80. Review.

Araujo-Jorge TC, Waghabi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Higuchi Mde L, Keramidas M, et al. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardopathy. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(12):1823-8.

Araújo-Jorge TC, Waghabi MC, Bailly S, Feige JJ. The TGF- $\beta$  pathway as an emerging target for Chagas disease therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(5):613-21.

Araújo-Jorge TC, Waghabi MC, Soeiro Mde N, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardopathy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19(5-6):405-13.

Atilla G, Emingil G, Köse T, Berdeli A. TGF-beta1 gene polymorphisms in periodontal diseases. *Clin Biochem*. 2006; 39(9):929-34.

Ayo CM, Dalalio MM, Visentainer JE, Reis PG, Sippert EÂ, Jarduli LR, Alves HV, Sell AM. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *Biomed Res Int.* 2013; 284729.

Bhayal AC, Prabhakar B, Rao KP, Penchikala A, Ayesha Q, Jyothy A, Nallari P, Venkateshwari A. Role of transforming growth factor- $\beta$ 1 -509 C/T promoter polymorphism in gastric cancer in south Indian population. *Tumour Biol.* 2011 Oct;32(5):1049-53.

Boesen CC, Radaev S, Motyka SA, Patamawenu A, Sun PD. The 1.1 Å crystal structure of human TGF- $\beta$  type II receptor ligand binding domain. *Structure.* 2002 Jul;10(7):913-9.

Brunner G, Blakytyn R. Extracellular regulation of TGF- $\beta$  activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury. *Thromb Haemost.* 2004; 92(2):253-61.

Brazilian Consensus on Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38 Suppl 3:7-29

Cai Q, Tang Y, Zhang M, Shang Z, Li G, Tian J, Jiang N, Quan C, Niu Y. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(2):240-53.

Calzada JE, Beraún Y, González CI, Martín J. Transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine.* 2009; 149–153.

Chagas C. Nova tripanosomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909; 1: 159-218.

Choi YJ, Kim N, Shin A, Lee HS, Nam RH, Chang H, Shin CM, Park YS, Lee DH, Park JH, Jung HC. Influence of TGFB1 C-509T polymorphism on gastric cancer risk associated with TGF- $\beta$ 1 expression in the gastric mucosa. *Gastric Cancer*. 2014 Aug 14.

Clayton J. Chagas disease 101. *Nature*. 2010; 465(7301):S4-5.

Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, Gollob KJ, Dutra WO. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis*. 2009;199(3):451-4.

Costa-Júnior FM, Maia ACB. Concepções de Homens Hospitalizados sobre a Relação entre Gênero e Saúde. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*. 2009; 25:055-063.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102 Suppl 1:113-22.

Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104 Suppl 1:31-40.

Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol*. 2002; 18(4):171-6.

Cruz M, Fragoso JM, Alvarez-León E, Escobedo-de-la-Peña J, Valladares A, Juárez-Cedillo T, Pérez-Méndez O, Vargas-Alarcón G. The TGF-B1 and IL-10 gene polymorphisms are associated with risk of developing silent myocardial ischemia in the diabetic patients. *Immunol Lett*. 2013 Nov-Dec;156(1-2):18-22.

Cruz-Robles D, Chávez-González JP, Cavazos-Quero MM, Pérez-Méndez O, Reyes PA, Vargas-Alarcón G. Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility. *Immunol Invest*. 2009; 38(3-4):231-9.

de Oliveira FL, Araujo-Jorge TC, de Souza EM, de Oliveira GM, Degraive WM, Feige JJ. Oral administration of GW788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(6):e1696.

de Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41(10):2069-80.

de Souza W. *Trypanosoma cruzi*-Host Cell Interaction. *Front Immunol*. 2014 Aug 4;5:339.

de Souza, W, de Carvalho, TMU, Barrias, ES. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*. 2010. Volume 2010, Article ID 295394, 18 pages.

de Souza, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8, 269-285 269.

Derynck R, Rhee L, Chen EY, Tilburg AV. Intron-exon structure of the human transforming growth factor- $\beta$  precursor gene. *Nucleic Acid Res*. 1987; 15, 3188–3189

Dias JC. Notes about *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Jul-Aug;39(4):370-5. Review.

Dubner S, Schapachnik E, Riera AR, Valero E. Chagas disease: state-of-the-art of diagnosis and management. *Cardiol J*. 2008;15(6):493-504.

Elias MC, da Cunha JP, de Faria FP, Mortara RA, Freymüller E, Schenkman S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist*. 2007; 158(2):147-57.

Fujii D, Brissenden JE, Derynck R, Francke U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet.* 1986; 12(3):281-8.

Garcia-Alvarez A, Sitges M, Pinazo MJ, Regueiro-Cueva A, Posada E, Poyatos S, Ortiz-Pérez JT, Heras M, Azqueta M, Gascon J, Sanz G. Chagas cardiomyopathy: the potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 21;4(9).

Golden JM, Tarleton RL. Trypanosoma cruzi: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol.* 1991; 72(4):391-402.

Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet.* 1999 Jan;8(1):93-7.

Guney I, Selcuk NY, Altintepe L, Atalay H, Başarali MK, Büyükbaş S. Henao-Martínez AF, Schwartz DA, Yang IV. Chagasic cardiomyopathy, from acute to chronic: is this mediated by host susceptibility factors? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Sep;106(9):521-7.

He HR, Li YJ, He GH, Wang YJ, Zhai YJ, Xie J, Zhang WP, Dong YL, Lu J. The adenosine deaminase gene polymorphism is associated with chronic heart failure risk in Chinese. *Int J Mol Sci.* 2014 Aug 28;15(9):15259-71.

Henao-Martínez AF, Schwartz DA, Yang IV. Chagasic cardiomyopathy, from acute to chronic: is this mediated by host susceptibility factors? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(9):521-7.

Heringer-Walther S, Moreira MCV, Wessel N, Saliba JL, Silvia-Barra S, Pena JLB, Becker S, Siems WE, Schultheiss HP, Walther T. Brain natriuretic peptide predicts survival in Chagas' disease more effectively than atrial natriuretic peptide. *Heart.* 2005; 91(3): 385–387.

Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423(3):157-60.

Higuchi Mde L. Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1997 Jan-Feb;39(1):53-60. Review.

Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158(6):1958-62.

Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun.* 1996; 64(9):3800-10.

Jevtović-Stoimenov T, Despotović M, Pešić Z, Cosić A. Lack of Association of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  G-308A and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 C-509T Polymorphisms in Patients with Deep Neck Space Infections. *Balkan J Med Genet.* 2013;16(2):59-66.

Kamato D, Burch ML, Piva TJ, Rezaei HB, Rostam MA, Xu S, Zheng W, Little PJ, Osman N. Transforming growth factor-b signaling role and consequences of Smad linker region phosphorylation. *Cell Signal.* 2003; 25(10):2017-24

Kanra AR, Tulgar-Kinik S, Verdi H, Ataç FB, Yazici AC, Ozbek N. Transforming growth factor-beta1 (509 C/T, 915 G/C, 869 T/C) polymorphisms are not related to obesity in Turkish children. *Turk J Pediatr.* 2011; 53(6):645-50.

Kim JJ, Choi YM, Chung SH, Yoon SH, Lee KS, Ku SY, Kim JG, Moon SY. Analysis of the transforming growth factor beta1 gene -509 C/T polymorphism in patients with advanced-stage endometriosis. *Fertil Steril.* 2010; 93(7):2121-4.

Kim IY, Kim MM, Kim SJ. Transforming growth factor-beta; biology and clinical relevance. *J Biochem Mol Biol*. 2005; 31(1):1-8

Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Iwao H. Effects of an AT1 receptor antagonist, an ACE inhibitor and a calcium channel antagonist on cardiac gene expressions in hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1996; 118(3):549-56.

Koch W, Hoppmann P, Mueller JC, Schömig A, Kastrati A. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with myocardial infarction in patients with angiographically proven coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 May;26(5):1114-9.

Kropf SP, Massarani L. Carlos Chagas, a ciência para combater doenças tropicais; Rio de Janeiro: Museu da Vida / Casa de Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 2009.

Lapa JS, Saraiva RM, Hasslocher-Moreno AM, Georg I, Souza AS, Xavier SS, do Brasil PE. Dealing with initial inconclusive serological results for chronic Chagas disease in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Jun;31(6):965-74.

Laucella S, Salcedo R, Castañós-Velez E, Riarte A, De Titto EH, Patarroyo M, Orn A, Rottenberg ME. Increased expression and secretion of ICAM-1 during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 1996;18(5):227-39.

Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004 May;18(7):816-27. Review.

Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13(4):342-8.

Luedeking EK, DeKosky ST, Mehdi H, Ganguli M, Kamboh MI. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease. *Hum Genet.* 2000;106(5):565-9.

Mady C, Salemi VMC, Ianni BM, Ram FJAI, Arteaga E. Maximal Functional Capacity, Ejection Fraction, and Functional Class in Chagas Cardiomyopathy. Are these Indices Related? *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2005;84:2

Marin-Neto JA, Simões MV, Sarabanda AV. Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol.* 1999 Mar;72(3):247-80. Review.

Marin-Neto JA, Almeida Filho OC, Pazin-Filho A, Maciel BC. Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 79(6):623-7.

Marin-Neto JA, Simões MV, Sarabanda AV. Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol.* 1999;72(3):247-80.

Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Avezum A Jr, Mattos AC, Rassi A, Morillo CA, Sosa-Estani S, Yusuf S; BENEFIT Investigators. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104 1:319-24.

Marques DS, Canesin MF, Barutta Júnior F, Fuganti CJ, Barretto AC. Evaluation of asymptomatic patients with chronic Chagas disease through ambulatory electrocardiogram, echocardiogram and B-Type natriuretic peptide analyses. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 87(3):336-43.

Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes & development.* 2000;14(6):627-44.

Massagué J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 2006 May 22;580(12):2811-20. Epub 2006 Apr 21. Review.

Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*. 2000 Apr 17;19(8):1745-54. Review

Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:753-91.

Melek K, Ulubay G, Sarınc Ulaşlı S, Verdi H, Ataç B, Öner Eyüboğlu F. Associations between TGF- $\beta$ 1 G/A and TNF- $\alpha$  308 G/A gene polymorphisms with airway resistance in chronic obstructive pulmonary disease. *Tuberk Toraks*. 2013; 61(1):1-11.

Melo RB, Parente GB, Victor EG. Measurement of human brain natriuretic peptide in patients with Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol*. 2005;84(2):137-40.

Minai K, Ogawa T, Kawai M, Komukai K, Tanaka T, Ogawa K, Nagoshi T, Arase S, Morimoto S, Inoue Y, Sekiyama H, Urabe A, Matsuo S, Hongo K, Yoshimura M. The Plasma B-Type Natriuretic Peptide Levels Are Low in Males with Stable Ischemic Heart Disease (IHD) Compared to Those Observed in Patients with Non-IHD: A Retrospective Study. *PLoS One*. 2014; 9(10):e108983.

Ming M, Ewen ME, Pereira ME. *Trypanosome* invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*. 1995; 82(2): 287-96.

Nabrdalik K, Gumprecht J, Adamczyk P, Górczyńska-Kosiorz S, Zywiec J, Grzeszczak W. Association of rs1800471 polymorphism of TGFB1 gene with chronic kidney disease occurrence and progression and hypertension appearance. *Arch Med Sci*. 2013 Apr 20;9(2):230-7.

Najar RA, Ghaderian SM, Panah AS. Association of transforming growth factor- $\beta$ 1 gene polymorphisms with genetic susceptibility to acute myocardial infarction. *Am J Med Sci*. 2011 Nov;342(5):365-70.

Nascimento CA, Gomes VA, Silva SK, Santos CR, Chambela MC, Madeira FS, Holanda MT, Brasil PE, Sousa AS, Xavier SS, Hasslocher-Moreno AM, Cunha

AB, Saraiva RM. Left atrial and left ventricular diastolic function in chronic Chagas disease. *J Am Soc Echocardiogr.* 2013; 26(12):1424-33.

Omrani MD, Bagheri M, Bushehri B, Azizi F, Anoshae MR. The association of TGF- $\beta$ 1 codon 10 polymorphism with suicide behavior. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2012; 159B(7):772-5.

OMS 2014 - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

DATASUS 2012 - <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>

Osorio L, Ríos I, Gutiérrez B, González J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes Infect.* 2012;14(15):1390-402.

Parra AV, Rodrigues V, Cancellia S, Cordeiro JA, Bestetti RB. Impact of socioeconomic status on outcome of a Brazilian heart transplant recipients cohort. *Int J Cardiol.* 2008; 125(1):142-3.

Pasha HF, Radwan MI, Hagrass HA, Tantawy EA, Emara MH. Cytokines genes polymorphisms in chronic hepatitis C: impact on susceptibility to infection and response to therapy. *Cytokine.* 2013;61(2):478-84.

Pazin-Filho A, Romano MM, Gomes Furtado R, de Almeida Filho OC, Schmidt A, Marin-Neto JA, Maciel BC. Left ventricular global performance and diastolic function in indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease. *J Am Soc Echocardiogr.* 2007; 20(12):1338-43.

Pehlivan M, Okan V, Sever T, Balci SO, Yilmaz M, Babacan T, Pehlivan S. Investigation of TNF-alpha, TGF-beta 1, IL-10, IL-6, IFN-gamma, MBL, GPIA, and IL1A gene polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Platelets.* 2011; 22(8):588-95.

Pereira IR, Vilar-Pereira G, Silva AA2, Moreira OC3, Britto C3, Sarmento ED1, Lannes-Vieira J. Tumor necrosis factor is a therapeutic target for immunological unbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental Chagas' heart disease. *Mediators Inflamm.* 2014; 798078.

Pereira Júnior CB, Filho BM. Preditores clínicos e ecocardiográficos de mortalidade na cardiopatia chagásica - revisão sistemática *Arq. Bras. Cardiol.* 2014 vol.102 no.6 São Paulo.

Pereira-Barretto AC, Carlo CH, Cardoso JN, Ochiai ME, Lima MV, Curiati MC, Scipioni AR, Ramires JA. Role of BNP levels on the prognosis of decompensated advanced heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(3):281-7.

Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Berbert LR, Revelli S, Beloscar J, Savino W, Bottasso O. Immunoneuroendocrine alterations in patients with progressive forms of chronic Chagas disease. *J Neuroimmunol.* 2011; 235(1-2):84-90.

Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol.* 1998; 6(3):193-7.

Pinazo MJ, Cañas E, Elizalde JI, García M, Gascón J, Gimeno F, Gomez J, Guhl F, Ortiz V, Posada Ede J, Puente S, Rezende J, Salas J, Saravia J, Torrico F, Torrus D, Treviño B. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterol Hepatol.* 2010 Mar;33(3):191-200. Review.

Pohlert D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(8):746-56.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2001 Sep;1(2):92-100. Review.

Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, Cucunubá ZM. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health*. 2014; 61(7):477-9.

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012 Jun;26(2):275-91. Review.

Rassi A Jr, Dias JC, Marin-Neto JA, Rassi A. Challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention of Chagas disease. *Heart*. 2009; 95(7): 524-34.

Rassi A Jr., Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clinical cardiology*. 2000;23(12):883-9.

Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 17;375(9723):1388-402.

Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:152-8.

Ribeiro A, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MOC. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2012 Oct;9(10):576-89.

Roberto P. Echodopplercardiographic Findings in Chagas's Disease *Rev bras ecocardiogr imagem cardiovasc*. 2011; 24(3):84-88

Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(9):5339-43.

Rodríguez-Pérez JM, Cruz-Robles D, Hernández-Pacheco G, Pérez-Hernández N, Murguía LE, Granados J, Reyes PA, Vargas-Alarcón G. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett.* 2005; 98(1):97-102.

Romano PS, Cueto JA, Casassa AF, Vanrell MC, Gottlieb RA, Colombo MI. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. *IUBMB Life.* 2012 May;64(5):387-96.

Rossi MA. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *Int J Cardiol.* 1998; 66(2):183-94.

Rossi MA. Patterns of myocardial fibrosis in idiopathic cardiomyopathies and chronic Chagasic cardiopathy. *Can J Cardiol.* 1991 Sep;7(7):287-94.

Saharinen J, Taipale J, Keski-Oja J. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J.* 1996; 15;15(2):245-53.

Samara S, Kollia P, Dailiana Z, Chassanidis C, Papatheodorou L, Koromila T, Malizos KN. Predictive role of cytokine gene polymorphisms for the development of femoral head osteonecrosis. *Dis Markers.* 2012; 33(4):215-21.

Samudio M, Montenegro-James S, Kasamatsu E, Cabral M, Schinini A, Rojas De Arias A, James MA. Local and systemic cytokine expression during experimental chronic *Trypanosoma cruzi* infection in a *Cebus* monkey model. *Parasite Immunol.* 1999; 21(9):451-60.

Saraiva RM, Waghabi MC, Vilela MF, Madeira FS, Sperandio da Silva GM, Xavier SS, Feige JJ, Hasslocher-Moreno AM, Araujo-Jorge TC. Predictive value of transforming growth factor- $\beta$ 1 in Chagas disease: towards a biomarker surrogate of clinical outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(8):518-25.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010 Jul-Aug;115(1-2):14-21.

Schmunis, GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Vol. 102 (Suppl. I): 75-85.

Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003; 13;113(6):685-700. Review.

Silva CE, Ferreira LD, Peixoto LB, Monaco CG, Gil MA, Ortiz J, Ianni BM, Andrade JL, Mathias Júnior W, Barretto AC. Evaluation of segmentary contractility in Chagas' disease by using the integral of the myocardial velocity gradient (myocardial strain) obtained through tissue Doppler echocardiography. *Arq Bras Cardiol.* 2005; 84(4):285-91.

Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *The Journal of experimental medicine.* 1991;174(3):539-45.

Sociedade Brasileira de Infectologia, 2014:  
<http://www.infectologia.org.br/publico/doencas?id=175>

Son JY, Kim SY, Cho SH, Shim HS, Jung JY, Kim EY, Lim JE, Park BH, Kang YA, Kim YS, Kim SK, Chang J, Park MS. TGF- $\beta$ 1 T869C polymorphism may affect susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis and disease severity. *Lung.* 2013 Apr;191(2):199-205.

Stoll C, Mengsteab S, Stoll D, Riediger D, Gressner AM, Weiskirchen R. Analysis of polymorphic TGFB1 codons 10, 25, and 263 in a German patient group with non-syndromic cleft lip, alveolus, and palate compared with healthy adults. *BMC Med Genet.* 2004; 22;5:15.

Susianti H, Gunawan A2, Putri JF3, Purnomo BB4, Handono K1, Kalim H. The Potential effect of G915C polymorphism in regulating TGF- $\beta$ 1 transport into Endoplasmic Reticulum for cytokine production. *Bioinformation*. 2014b; 10(8):487-90.

Susianti H, Handono K, Purnomo BB, Widodo N, Gunawan A, Kalim H. Changes to signal peptide and the level of transforming growth factor-  $\beta$ 1 due to T869C polymorphism of TGF  $\beta$ 1 associated with lupus renal fibrosis. *Springerplus*. 2014a; 10;3:514.

Syrris P, Carter ND, Metcalfe JC, Kemp PR, Grainger DJ, Kaski JC, Crossman DC, Francis SE, Gunn J, Jeffery S, Heathcote K. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)*. 1998; 95(6):659-67.

Tamizifar B, Lankarani KB, Naeimi S, Rismankar Zadeh M, Taghavi A, Ghaderi A. Promoter polymorphism of transforming growth factor-beta1 gene and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2008; 14;14(2):243-7.

Tao HM, Chen GZ, Lu XD, Hu XG, Chen GP, Shao B. TGF-beta 1 codon 10 polymorphism is associated with cerebral SVD. *Can J Neurol Sci*. 2011; 38(6):869-73.

Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Postgrad Med J*. 2006; 82(974):788-98.

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2012 Aug;6(8):e1749.

van der Wal EA, Gómez-Pinilla F, Cotman CW. Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies. *Neuroreport*. 1993; 4(1):69-72.

Vasconcelos RH, Montenegro SM, Azevedo EA, Gomes YM, Morais CN. Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: an overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. *Cytokine*. 2012;59(2):203-8.

Waghabi MC, Coutinho-Silva R, Feige JJ, Higuchi Mde L, Becker D, Burnstock G, et al. Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor-beta treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009b;104(8):1083-90.

Waghabi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidas M, Feige JJ, Araujo-Jorge TC, et al. Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009a;53(11):4694-701.

Waghabi MC, Keramidas M, Bailly S, Degrave W, Mendonca-Lima L, Soeiro Mde N, et al. Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *The American journal of pathology*. 2005b;167(4):993-1003.

Waghabi MC, Keramidas M, Calvet CM, Meuser M, de Nazare CSM, Mendonca-Lima L, et al. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(8):2905-10.

Waghabi MC, Keramidas M, Feige JJ, Araujo-Jorge TC, Bailly S. Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cellular microbiology*. 2005a;7(4):511-7.

Watanabe T, Yamamoto T, Ikegaya N, Fujigaki Y, Suzuki H, Togawa A, Fukasawa H, Nagase M, Hishida A. Transforming growth factor-beta receptors in self-limited vs. chronic progressive nephritis in rats. *J Pathol*. 2002 Nov;198(3):397-406.

Wong VY, Laping NJ, Nelson AH, Contino LC, Olson BA, Gygielko E, Campbell WG Jr, Barone F, Brooks DP. Renoprotective effects of carvedilol in hypertensive-stroke prone rats may involve inhibition of TGF beta expression. *Br J Pharmacol.* 2001; 134(5):977-84.

Wu GY, Lu Q, Hasenberg T, Niedergethmann M, Post S, Sturm JW, Keese M. Association between EGF, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  gene polymorphisms and cancer of the pancreatic head. *Anticancer Res.* 2010; 30(12):5257-61.

Wu Z, Xu M, Sheng H, Lou Y, Su X, Chen Y, Lu L, Liu Y, Jin W. Association of natriuretic peptide polymorphisms with left ventricular dysfunction in southern Han Chinese coronary artery disease patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 15;7(10):7148-57.

Xu HY, Hou XW, Wang LF, Wang NF, Xu J. Association between transforming growth factor beta1 polymorphisms and left ventricle hypertrophy in essential hypertensive subjects. *Mol Cell Biochem.* 2010 Feb;335(1-2):13-7.

Yamada Y, Fujisawa M, Ando F, Niino N, Tanaka M, Shimokata H. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with blood pressure in Japanese individuals. *J Hum Genet.* 2002;47(5):243-8.

Yao W, Wang ZM, Wang MZ, Hao CF, Wang N. The relationship between the concentration of TGF-beta1 in serum and its gene polymorphisms in CWP. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2005 Nov;36(6):827-9.

Yim HE, Bae IS, Yoo KH, Hong YS, Lee JW. Genetic control of VEGF and TGF-beta1 gene polymorphisms in childhood urinary tract infection and vesicoureteral reflux. *Pediatr Res.* 2007; 62(2):183-7.

Yokota M, Ichihara S, Lin TL, Nakashima N, Yamada Y. Association of a T29--&gt;C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation.* 2000; 20;101(24):2783-7.

Zacks, MA. Impairment of cell division of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007, Vol. 102(1): 111-115.

Zhang SH, Wang J, Jin TR, Zhang LX, Shao J. The role of spironolactone in the metabolism of serum type I collagen in elderly patients with atrial fibrillation. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014;18(19):2903-7.

Zhang L, Tarleton RL. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Exp Parasitol. 1996; 84(2):203-13.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR.

## 8. ANEXO

### 8.1. Parecer do comitê de Ética

<b>INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - IPEC / FIOCRUZ</b>	
------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------

#### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Polimorfismo dos alelos do gene do TGF-  $\beta$ 1 e correlação com os estágios da forma cardíaca da doença de Chagas

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 02826212.6.0000.5262

**Pesquisador:** Roberto Magalhães Saraiva

**Instituição:** Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas -  
IPEC / FIOCRUZ

#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 94.346

**Data da Relatoria:** 10/09/2012

#### Apresentação do Projeto:

Estudo caso-controle que pretende caracterizar um marcador genético de prognóstico de progressão para os estágios mais avançados da forma crônica cardíaca da doença de Chagas, através da análise do padrão de expressão dos alelos do gene do fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ 1) correlacionando com a apresentação clínica da doença de Chagas. Os níveis séricos do TGF- $\beta$ 1, interferon gama (INF- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF) e angiotensina II serão dosados e também correlacionados com a frequência de expressão dos alelos do gene TGF- $\beta$ 1 e com as formas de apresentação da doença, pois parecem apresentar importante papel na patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica.

#### Objetivo da Pesquisa:

Correlacionar o polimorfismo dos genes do TGF- $\beta$ 1 e as formas clínicas da doença de Chagas, assim como a análise dos níveis séricos do TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , TNF e angiotensina II.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não apresenta riscos, tendo como benefício a possível determinação de um padrão genotípico que indique uma probabilidade de evolução para uma cardiomiopatia chagásica.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O coordenador da pesquisa acrescentou ao projeto as informações necessárias sobre o método molecular de escolha e modificou o TCLE, incluído a informação sobre a dosagem das diversas citocinas e a explicação sobre a análise das mesmas.

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

Adequados

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

Sem pendências.

<b>Endereço:</b> Avenida Brasil 4385		<b>CEP:</b> 21.045-900
<b>Bairro:</b> Manginhos		
<b>UF:</b> RJ	<b>Município:</b> RIO DE JANEIRO	
<b>Telefone:</b> 2138-6595	<b>Fax:</b> 2138-6595	<b>E-mail:</b> cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA  
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -  
IPEC / FIOCRUZ



**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O colegiado considerou o projeto aprovado.

RIO DE JANEIRO, 14 de Setembro de 2012

---

Assinado por:  
Léa Ferreira Camillo-Coura

Endereço: Avenida Brasil 4365  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.045-900  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: 2138-6595 Fax: 2138-6595 E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

## 8.2. Termo de Consentimento



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ



INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
LABORATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇA DE CHAGAS

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### Projeto: Polimorfismo dos alelos do gene do TGF- $\beta$ 1 e correlação com os estágios da forma cardíaca da doença de Chagas

Você está sendo convidado a participar de um estudo sobre doença de Chagas onde vamos avaliar o perfil genético para o TGF  $\beta$ 1 e dosar no sangue o nível do TGF  $\beta$ 1, do IFN- $\gamma$  e do TNF. O TGF  $\beta$ 1 é uma substância encontrada normalmente nas pessoas, mas cujo nível aumentado pode ou não fazer com que a pessoa com doença de Chagas tenha maior risco de evoluir com problemas no coração. O IFN- $\gamma$  e o TNF podem interferir nesse efeito do TGF  $\beta$ 1 sobre o coração do paciente com doença de Chagas.

Para participar deste estudo o (a) Sr.(a)., como voluntário, deverá ser submetido a uma coleta de seu sangue para testes em laboratório. A quantidade de sangue que iremos coletar é de 10 ml, equivalente a uma colher de sopa. A coleta de sangue que será realizada poderá causar um pequeno desconforto (semelhante a uma picada de inseto), com eventual, transitória e pequena ardência no local da coleta.

Esteja ciente que sua participação é VOLUNTÁRIA, o que significa que o (a) Sr. (a) poderá decidir se quer ou não participar deste estudo, ou caso haja qualquer DESCONFORTO ou CONSTRANGIMENTO durante o mesmo o Sr.(a) poderá solicitar a não participação ou desistência do estudo. Caso não aceite ou desista de participar do estudo, seu tratamento ocorrerá sem nenhum prejuízo.

Este estudo ocorrerá de forma CONFIDENCIAL e manterá seu ANONIMATO em todos os exames que realizar e também sobre seu diagnóstico. Somente a equipe de profissionais envolvida neste estudo terá conhecimento dos resultados dos exames que realizar e do conteúdo que foi informado durante a(s) consulta(s).

A sua participação neste estudo é fundamental e poderá gerar benefícios para você ou para as pessoas portadoras de doença de Chagas no futuro, após o término do estudo.

Por último, o Sr.(a) deverá estar ciente que participando deste projeto, estará autorizando o armazenamento da amostra de sangue utilizada por um período mínimo de 5 anos. Esta amostra não será utilizada para outra finalidade ou outra pesquisa sem aviso prévio.

Em caso de participação voluntária, este documento deverá ser assinado em duas vias onde uma ficará com você voluntário ou responsável e outra com o pesquisador.

Em caso de qualquer dúvida, o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com o Coordenador do Projeto Roberto Magalhães Saraiva, no IPEC – FIOCRUZ no endereço: Av. Brasil, 4365, IPEC, Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP.: 21.040-361. Telefones: 38659648.

Rubrica do Paciente do Estudo: \_\_\_\_\_ Rubrica do Representante Legal "se houver": \_\_\_\_\_ Rubrica do membro da equipe que obteve o Termo: \_\_\_\_\_