

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS  
INFECCIOSAS

LARISSA CATHARINA COSTA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE *IFNG*  
+874T/A COM A CARDIOPATIA CHAGÁSICA  
CRÔNICA**

Rio de Janeiro

2011

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE *IFNG*  
+874T/A COM A CARDIOPATIA CHAGÁSICA  
CRÔNICA**

LARISSA CATHARINA COSTA

Dissertação apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida

Rio de Janeiro

2011

LARISSA CATHARINA COSTA

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE *IFNG*  
+874T/A COM A CARDIOPATIA CHAGÁSICA  
CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Maria da Gloria Bonecini de Almeida

Aprovada em 29 /04 /2011

**BANCA EXAMINADORA**

**Dr. Sérgio Salles Xavier (presidente)**

**Dra. Maria de Fátima Madeira**

**Dra. Bianca Olivieri Perdigão**

**Dr. Rosely Maria Zancope Oliveira (suplente)**

Rio de Janeiro

2011

A Deus por estar sempre presente ao meu lado nos momentos difíceis e nos momentos de felicidade.

Aos meus pais por estarem sempre presentes mesmo de longe, por todos os sacrifícios e toda a confiança.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a Deus por ter me trazido ao mundo, por estar comigo SEMPRE, por não me deixar desanimar NUNCA nos momentos de dificuldade e ter me feito crescer durante estes anos. Por escutar pacientemente meus pedidos de socorro, por ter me dado os meus pais, meus amigos que são os bens mais preciosos que tenho.

Aos meus pais, Eliana e Juscelino, por TUDO! Pelo amor, criação, orações, dedicação, sacrifícios, pois sei que estes foram inúmeros para me dar a oportunidade de chegar até onde cheguei. Gostaria que soubessem que tento todos os dias fazer com que vocês se orgulhem de mim.

Ao meu irmão Vinícius Catharina por me ajudar sempre. Eu sei o esforço que você faz para que eu possa continuar onde estou.

À minha avó Nadir de Campos Catharina por estar todos os dias ao meu lado mesmo estando no céu.

À minha tia Dida e à minha avó Maria pelas orações. Todas elas fizeram e fazem efeito SEMPRE. Por favor, continuem rezando sempre por mim.

À minha família que sempre me apoiou e sempre se orgulhou de mim.

À querida orientadora Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida pela oportunidade, ensinamentos, confiança, amizade, carinho. Eu nunca esqueço o que a senhora fez por mim e gostaria que soubesse que se cheguei até aqui a senhora foi uma grande culpada!

À minha querida amiga Ingrid Miler Valiengo que se tornou uma irmã dividindo apartamento comigo me aturando, me aconselhando e me fazendo rir enquanto eu só pensava em querer chorar durante todos desses anos de convívio. Obrigada por me aguentar!! Você sabe que é importante para mim, sabe que eu te amo e sabe

também que quando você casar vai ter que me levar junto. Agradeço à sua família também que me acolheu como “filha mais nova da tia Juju”.

Ao meu anjo da guarda Monique Ribeiro de Lima que foi mais que uma amiga de trabalho, mais que uma irmã, foi um anjo da guarda literalmente escolhido por Deus para estar comigo todos os dias, no trabalho e na minha vida. Anjos existem e eu encontrei o meu. Nunca vou esquecer o que você fez e faz por mim. Amo-te. Agradeço ao Gustavo Pavetits, marido da Monique, por me aturar inúmeras vezes em seu apartamento.

Às minhas irmãs da carona: Ana Carolina, Lizânia, Mariana, Paula, Raquel e Renata que fizeram minhas idas e vindas para Fiocruz as melhores possíveis. Obrigada por todas as risadas, todos os conselhos, pelo amor e carinho que vocês têm por mim. Chega até ser impossível escrever sobre vocês. Amo todas vocês. É claro que eu não poderia esquecer o meu príncipe, o nosso mascote da carona, Cadu. Tia Lalá Lelé te ama!

Aos queridos amigos do Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas principalmente: Ana Cristina, Ana Teresa, Andréia, Márcia, Maíra e Maristela pela amizade dentro e fora da Fiocruz e por sempre estarem ao meu lado.

À Ana Carolini, Alessandra Barbosa, Marcio Mantuano, Davi Oliveira e Igor Teixeira pela enorme ajuda durante esses dois anos de projeto. MUITO OBRIGADA!

Às minhas amigas do Mestrado: Adriana Pedro, Maria Clara Amorin, Patrícia Santiago e Roíza Rodrigues pelos momentos divertidos durante os intervalos e durante os nossos almoços.

À minha amiga Cecília Portugal Manhães pela amizade e por ter me estendido a mão no momento que mais precisei. Nem sei se você acha isso importante, mas eu sim e NUNCA vou esquecer.

Aos meus amigos de Bom Jesus do Itabapoana, Niterói e Rio de Janeiro que são tantos (graças a Deus) que seria até injusto escrever os nomes, pois poderia acabar esquecendo algum, pela amizade incondicional.

Aos Doutores. Sérgio Salles Xavier, Gécio de Alvarenga Filho e Luiz Henrique Conde Sangenis pela participação e inclusão dos pacientes no projeto.

Ao Dr. Marcelo Teixeira de Holanda pela monstruosa ajuda, pela inclusão de pacientes e por me aturar pacientemente batendo à sua porta com as minhas perguntas chatas. Ah, e é claro, pela ajuda na tabela do SPSS.

À Dra. Maria José de Andrada Serpa pela ajuda, conselhos, orientação e revisão durante os seminários do Mestrado.

E por fim agradeço a todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo, pois sem eles nada seria possível.

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz é o que realmente importa.”

Madre Teresa de Calcutá

Catharina-Costa, L. **Associação do polimorfismo de *IFNG* +874T/A com a cardiopatia chagásica crônica.** Rio de Janeiro, 2011. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Evandro Chagas.

## RESUMO

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Atualmente afeta cerca de 10 milhões de pessoas nas Américas, e aproximadamente 90 milhões de pessoas se encontram em áreas de risco. A cardiopatia chagásica crônica (CCC) se desenvolve em um terço dos indivíduos infectados e corresponde a uma miocardite crônica fibrosante intensa e os possíveis fatores que podem contribuir para o desenvolvimento desta podem estar relacionados com a carga parasitária, a cepa do parasita, a autoimunidade e fatores genéticos do parasita e do hospedeiro. Citocinas e quimiocinas têm um importante papel no desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra o parasita, porém esta pode estar envolvida com o aumento da inflamação encontrada no miocárdio de pacientes com CCC. O principal objetivo deste estudo foi identificar a frequência dos genótipos e alelos para o SNP no *IFNG* na posição +874T/A através da técnica de ARMS-PCR, em 102 pacientes soropositivos para o *T. cruzi* apresentando a CCC, 86 pacientes soropositivos sem cardiopatia aparente e 179 controles soronegativos para *T. cruzi*. Não há diferença estatística quando pacientes com CCC foram comparados com indivíduos saudáveis, indicando que o polimorfismo para *IFNG* na posição +874T/A não parece ter influência na infecção. Contudo, observamos que o genótipo AA foi mais frequentemente encontrado em pacientes portadores da CCC do que naqueles portadores da forma indeterminada, sugerindo que indivíduos com este genótipo estão mais susceptíveis ao aparecimento de lesões cardíacas e ao adoecimento ( $p= 0,024$ ). Pacientes carreadores do alelo A tem 1,82 vezes de chance de desenvolverem a CCC. De modo interessante, variações neste polimorfismo não estão associadas ao desenvolvimento de formas mais graves da CCC. Apesar de contraditório os portadores do genótipo TT, associado com a alta produção de IFN- $\gamma$ , parece ter papel protetor para o início do desenvolvimento da CCC. Estudos visando a associação da frequência dos genes que codificam o IFN- $\gamma$  e sua expressão devem ser abordados.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, Cardiopatia chagásica crônica, *Trypanosoma cruzi*, *IFNG* +874T/A e imunogenética.

Catharina-Costa, L. **Association of *IFNG* +874 T/A polymorphism with chronic Chagas' disease.** Rio de Janeiro, 2011. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Evandro Chagas..

## ABSTRACT

Chagas disease is a zoonosis caused by the parasite hemoflagellate *Trypanosoma cruzi*. Currently affects approximately 10 millions people in the Americas, where approximately 90 millions people are at risk areas. The Chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) develops in one third of infected individuals and represents a severe chronic myocarditi. Possible factors that may contribute to the development of several carioopathy can be related to parasite load and difference on strains, autoimmunity and the genetics of the parasite and host. Cytokines and chemokines play an important role in the development of a protective immune response against the parasite, but it may be involved with increased inflammation found in the myocardium of CCC. The main objective of this study was to identify the frequency of genotypes and alleles for the SNP in the *IFNG* position +874 T/A by ARMS-PCR technique in 102 patients seropositive for *T. cruzi* presenting the CCC, 86 seropositive patients without apparent heart disease and 179 negative controls for *T. cruzi*. There was no statistical difference when CCC patients were compared with healthy subjects, indicating that the polymorphism at the position +874 T/A does not seem to influence the infection. However, we observed that the AA genotype was more frequently found among patients with CCC than in patients without apparent heart disease, suggesting that individuals with this genotype are more susceptible to develop cardiac illness ( $p=0,024$ ). Patients carrying the A allele is 1.82-fold as likely to develop CCC. Interestingly, variations in this polymorphism are not associated with the development of more severe forms of the CCC. Although contradictory, the carriers of TT, genotype associated with high IFN- $\gamma$ , seem to have a protective role for the early development of the CCC. Studies toward the association of the frequency of genes encoding IFN- $\gamma$  and its expression must be addressed.

**Keywords:** Chagas disease, chronic chagasic cardiomyopathy, *Trypanosoma cruzi*, *IFNG* +874T/A and immunogenetic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Mapa geográfico das Américas, representando as áreas endêmicas com doença de Chagas.....	6
<b>Figura 2</b> – Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
<b>Figura 3</b> – Ilustração de criança apresentando o sinal de Romaña.....	10
<b>Figura 4</b> – Representação da resposta imune para doença de Chagas em pacientes portadores da forma crônica cardíaca ou forma indeterminada.....	26
<b>Figura 5</b> – Estrutura de um gene humano.....	27
<b>Figura 6</b> – Tipos de polimorfismos gênicos.....	29
<b>Figura 7</b> - Estadiamento do comprometimento miocárdio na cardiopatia chagásica crônica.....	35
<b>Figura 8</b> – Ilustração de um resultado de ARMS-PCR para o polimorfismo de IFN- $\gamma$ +874T/A .....	41
<b>Figura 9</b> – Gráfico referente à distribuição dos valores de fração de ejeção nos diferentes genótipos para o polimorfismo de IFN- $\gamma$ +874T/A.....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com doença de Chagas e indivíduos sadios.....	45
<b>Tabela 2:</b> Classificação clínica dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica de acordo com o Consenso Brasileiro em Chagas de 2005.....	47
<b>Tabela 3:</b> Frequência genotípica e alélica do <i>IFNG</i> +874T/A em pacientes com doença de Chagas e indivíduos controles sadios não provenientes de área endêmica para doença de Chagas.....	51
<b>Tabela 4:</b> Frequência genotípica e alélica do <i>IFNG</i> +874T/A em pacientes com doença de Chagas na fase crônica cardíaca e forma crônica indeterminada.....	52
<b>Tabela 5:</b> Frequência genotípica e alélica do <i>IFNG</i> +874T/A em pacientes com doença de Chagas na fase crônica cardíaca divididos em subgrupos e forma crônica indeterminada.....	53
.....	

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
<i>IFNG</i>	Gene que codifica o Interferon- $\gamma$
C3	Proteína do sistema complemento
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GPI	Molécula de superfície glicosil-fosfatidil-inositol
TS	Enzima trans-sialidase
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
APC	Células apresentadoras de antígenos
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
TLR	Receptores Toll-like
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
TNF- $\alpha$	Tumoral necrosis factor- $\alpha$ , (fator de necrose tumoral do tipo $\alpha$ )
IL	Interleucina
NO	Óxido nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintase
Th1 e Th2	Linfócitos T helper 1 e 2
Ig	Imunoglobulina
CD	Cluster of differentiation
HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR, antígeno leucocitário humano-DR

FoxP3	Forkhead box P3
LeIF	Interferon do leucócito
FIF	Interferon do fibroblasto
CARD 1	Pacientes com cardiopatia chagásica não dilatada
CRA	Antígeno citoplasmático repetitivo
UTR	Região não traduzida.
mRNA	RNA mensageiro
VNTR	Repetições Tandem
NK	<i>Natural Killer</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , (polimorfismo de único nucleotídeo)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiograma
mL	Mililitros
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , (ácido etilenodiaminotetracético)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
μL	Microlitro
RPM	Rotações por minuto
PCR-ARMS	Amplification refractory mutation system
TBE	Tampão Tris/borato/EDTA
CCC	Cardiopatia Chagásica Crônica
PHA	Phytohaemagglutinin (Fitohemaglutinina)
AA	Aminoácido

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	04
2.1. A DOENÇA DE CHAGAS.....	04
2.2 Ciclo de vida do <i>Trypanossoma cruzi</i> .....	06
2.3 Formas clínicas.....	08
<b>2.3.1 Fase aguda</b> .....	09
<b>2.3.2 Fase crônica</b> .....	12
2.3.2.1 Forma crônica indeterminada.....	12
2.3.2.2 Forma crônica cardíaca.....	13
2.3.2.3 Forma crônica digestiva.....	14
2.4 EVOLUÇÃO E PROGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	16
2.5 RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS.....	18
<b>2.5.1 Interferon-gama e a doença de Chagas</b> .....	23
2.6 POLIMORFISMOS.....	27
<b>2.6.1 Polimorfismos no IFNG</b> .....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	33
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	34
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL E CASUÍSTICA .....	34
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	35
4.3 Critérios de exclusão.....	36
4.4 Avaliação do polimorfismo de IFNG.....	37
<b>4.4.1 Obtenção de amostras biológicas</b> .....	37
<b>4.4.2 Extração de DNA</b> .....	37
<b>4.4.3 Amplificação por PCR-ARMS</b> .....	39

4.2.2.1 Determinação do polimorfismo de <i>IFNG</i> +874T/A.....	39
4.2.2.2 Eletroforese em gel de agarose.....	41
<b>4.5.6 Análise estatística dos resultados.....</b>	<b>42</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
5.1 CASUÍSTICA.....	43
5.2 Análise do polimorfismo para o gene <i>IFNG</i> .....	48
<b>5.2.1 Distribuição genotípica e alélica.....</b>	<b>48</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou também conhecida como tripanossomíase Americana é uma doença potencialmente fatal causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, inicialmente descrito em 1909 por Carlos Chagas. É encontrada principalmente na América Latina, onde é transmitida através das fezes de triatomíneos, conhecidos como "barbeiros", entre outros nomes, dependendo da área geográfica (WHO, 2010).

A prevalência da doença no Brasil ocorre de norte a sul, contudo, a forma que a infecção se manifesta é clinicamente variável. As variações nas apresentações clínicas regionais podem ser explicadas por diferenças na carga parasitária e pelas cepas de *T. cruzi* (Brum-Soares et al., 2010). Atualmente predominam os casos crônicos decorrentes de infecção por via vetorial, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de casos agudos da doença de Chagas tem sido observada em diferentes estados (Bahia, Ceará, Piauí, Santa Catarina e São Paulo), com maior frequência de casos e surtos registrados na Região da Amazônia Legal (Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Amapá, Pará e Tocantins) (Portal do Ministério da Saúde, 2009). Contudo, foram descritos bolsões de transmissão em áreas com grande concentração vetorial localizados na Microrregião do Médio Rio Negro, onde a transmissão ocorre pelo contato direto com o vetor *Rhodnius brethesi* que ataca os extrativistas da fibra e seus familiares (Brum-Soares et al., 2010).

A severidade e a prevalência das formas distintas da doença de Chagas diferem de região para região, Prata (2001), contudo as causas clínicas e epidemiológicas não são

completamente entendidas. Inicialmente, após a descoberta da infecção pelo *T. cruzi* em humanos, o parasita foi diretamente relacionado ao desenvolvimento da patologia (Chagas, 1909). Entretanto, a escassez de parasitas nos pacientes crônicos, juntamente com a intensa inflamação tecidual e detecção da auto-reatividade, levaram a proposta que a auto-imunidade poderia ter um papel na etiologia da doença (Cunha-Neto et al., 1996; Kierszenbaum, 1999). Com o desenvolvimento de novas técnicas capazes de detectar os parasitas em tecidos infectados, a ênfase foi transferida novamente para o parasita, e uma correlação direta acabou sendo estabelecida entre *T. cruzi* e a persistência da patologia (Jones et al., 1992; Tarleton et al., 1997).

De acordo com Macedo et al. (2004, revisão), existem três principais fases que caracterizam a história dos estudos em doença de Chagas em humanos: a fase do parasita; a fase da auto-imunidade e a fase genômica. Em recentes estudos, durante a fase genômica, a doença tem sido vista como um resultado da co-evolução dos genomas do parasita e dos humanos. Estudos sugerem que diferentes formas clínicas da doença de Chagas podem ser explicadas por variações no tropismo tecidual, um processo que é influenciado por propriedades genéticas tanto do hospedeiro quanto do parasita (Andrade et al., 2002; Vago et al., 2000).

Recentemente, uma grande perspectiva de se identificar marcadores de prognósticos tem sido apontada principalmente pelas alterações genotípicas que possam estar associadas ao desenvolvimento de quadro graves da cardiopatia chagásica crônica. Contudo, poucos relatos quanto à presença de genes relacionados à susceptibilidade na doença de Chagas têm sido reportados. O Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina de grande importância na resposta imune na doença de Chagas e pode estar envolvida tanto no controle da doença quanto na evolução para as formas mais graves (Moller et al. 2010). O polimorfismo do gene para *INFG* na posição +874 T/A foi descrito em diferentes doenças como câncer cervical, vitiligo, artrite em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico

(Tangwattanachuleeporn et al., 2007, Gangwar et al., 2009; Namian et al., 2009) e em infecções virais (hepatite B, Cheong et al., 2006; Zhou et al., 2009), bacterianas (tuberculose, revisado por Leandro et al., 2009) e parasitárias (Leishmaniose, Kamali-Sarvestani et al., 2006; Matos et al., 2007). A associação deste polimorfismo está diretamente ligada a população estudada e ao agente causal. Entender as diferenças da resposta imune que estão implicadas na indução de maior ou menor agressão tecidual é o grande desafio para a compreensão da patofisiologia da doença de Chagas.

Assim, a análise deste polimorfismo e sua correlação com a evolução clínica e com os achados imunológicos na nossa população poderão ser de grande importância em estudos futuros sobre a susceptibilidade à doença de Chagas de forma a obter marcadores que possam auxiliar na identificação de prognóstico para a cardiopatia chagásica crônica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana, é uma zoonose causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (revisto por Hoare, 1966). Atualmente estima-se que 75 a 90 milhões de pessoas estejam vivendo em áreas de risco, que se estendem do sul dos EUA ao sul da Argentina e Chile, e cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas e/ou possuem a doença (Coura & Dias, 2009) (Figura 1).

Esta doença foi descoberta e caracterizada por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1909 (Chagas, 1909), reportando seus elementos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos, bem como o seu agente etiológico e o vetor transmissor do parasito, um inseto da ordem Hemíptera. A doença de Chagas é considerada uma doença endêmica de grande importância mundial compondo o grupo de enfermidades infecciosas e parasitárias, sendo uma das principais causas de óbito em nosso país (Coura & Dias, 2009).

Os mecanismos de transmissão da infecção pelo parasito podem ser divididos em dois grupos: (i) o principal mecanismo é através dos vetores triatomíneos, transfusão de sangue, transmissão oral através de alimentos contaminados, transmissão placentária; (ii) e mecanismos secundários, através de acidentes em laboratórios, manejo de animais infectados, transplantes de órgãos, via sexual por meio do contato do esperma ou de fluidos menstruais contaminados com o *T. cruzi* e, hipoteticamente, inoculação dolosa. Agulhas

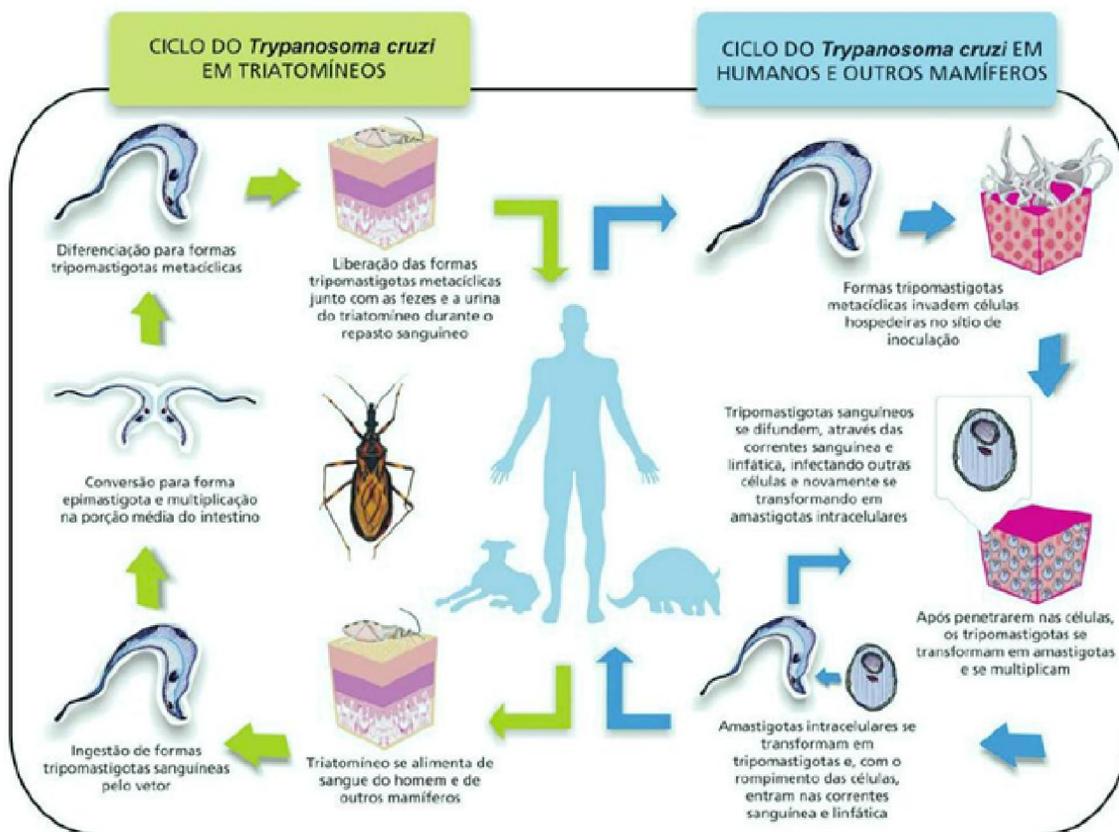
intravenosas compartilhadas com uma pessoa infectada é outra possibilidade de transmissão na população (Dias & Coura 1997; Coura 2007; Nijjar & del Bigio, 2007; Cordova et al., 2008).

Existem cerca de 150 espécies de triatomíneos, porém apenas 52 espécies são encontradas no Brasil, sendo 5 com hábitos domiciliares e 47 com hábitos selvagens. As espécies de triatomíneos mais importantes relacionadas com a transmissão vetorial são: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongilus megistus*, sendo que o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *T. dimidiata* são as três principais espécies transmissoras do *T. cruzi* em humanos (revisado por Rassi et al., 2010).

A doença de Chagas é uma zoonose própria de mamíferos silvestres, alguns deles tão antigos como o continente americano. *T. cruzi* infecta, em condições naturais, mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens. Dentre os reservatórios já descritos estão: preguiças, morcegos, roedores, marsupiais, coelhos, cães, primatas não-humanos e outros. Entre os reservatórios silvestres e/ou sinantrópicos mais amplamente distribuídos na América cita-se marsupial do gênero *Didelphis* e alguns roedores, especialmente os do gênero *Rattus*. Outros animais como suínos e caprinos foram encontrados infectados. Pássaros, répteis e peixes não se infectam, pois estes possuem lisinas que são capazes de eliminar o parasita (Barretto 1964; Deane 1964; Dias & Macedo 2005; Coura 2008).



*T. cruzi* possui variações morfológicas e funcionais, alternando entre estágios que sofrem divisão binária e as formas não replicativas e infectantes. Como formas replicativas estão incluídas os epimastigotas presentes no tubo digestivo do inseto vetor e amastigotas observados no interior das células de mamíferos. As formas não replicativas e infectantes, os tripomastigotas metacíclicos, são encontrados nas fezes e urina do inseto vetor e os tripomastigotas circulantes no sangue de mamíferos. Durante a fase no hospedeiro invertebrado, o parasita se transforma em epimastigotas e então, no intestino posterior, diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (um processo conhecido como metaciclogênese) os quais, eliminados pelas fezes e urina do inseto vetor, são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado. O ciclo no hospedeiro vertebrado, que pode ocorrer em diferentes espécies de mamíferos, tem início quando formas infectantes eliminadas pelo inseto vetor entram em contato com mucosas ou regiões lesadas da pele desses hospedeiros. As formas tripomastigotas metacíclicas são altamente infectantes, podendo invadir os primeiros tipos celulares que encontram, estes podem ser macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, entre outras. Uma vez dentro das células, o *T. cruzi* diferencia em formas amastigotas que, após vários ciclos reprodutivos, diferenciam-se em formas tripomastigotas sanguíneas. Estas últimas rompem a célula hospedeira, atingem a corrente circulatória e os tecidos do hospedeiro, onde vão invadir os mais diferentes tipos celulares (Dias et al., 2000) (Figura 2).



**Figura 2:** Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, Ict/Fiocruz.

<http://www.fiocruz.br/chagas/media/Versao%20em%20Portugues.pdf>

### 2.3 Formas clínicas

A classificação atualmente preponderante das formas clínicas da doença de Chagas considera a existência de uma fase aguda e de uma fase crônica, esta

última subdividida em forma indeterminada, forma cardíaca, forma digestiva, forma cardio-digestiva e forma nervosa.

(<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=167>).

### 2.3.1 Fase aguda

Esta forma tem as características clínicas de uma infecção generalizada, de gravidade variável, geralmente assintomática ou compreende os sintomas clínicos leves e inespecíficos como febre, mal-estar, esplenomegalia, linfadenopatia e edema leve. O diagnóstico é sugerido pela presença dos sinais de porta de entrada, ocular (sinal de Romana) ou cutâneo (chagoma de inoculação) (Figura 3), e comprovado pelo encontro dos parasitos no sangue periférico através dos exames diretos para o diagnóstico. A presença de miocardite e meningoencefalite severa também podem ocorrer em uma pequena proporção dos pacientes e é uma preocupação especial em crianças menores de 2 anos (revisto por Córdova et al., 2010). No entanto, na maioria dos pacientes, a fase aguda passa despercebida devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas. A fase aguda geralmente termina espontaneamente em 2 a 4 meses, no entanto, 5-10% dos pacientes sintomáticos morrem durante esta fase. Estas mortes ocorrem geralmente em crianças menores de 2 anos (Prata, 2001). O período de incubação, de acordo com observações feitas no homem e em animais de laboratório, varia entre 4-10 dias (Bonecini-Almeida et al., 1990). Do ponto de vista laboratorial, delimita-se imprecisamente, pela demonstração do parasito no sangue por meio de exame direto e pela presença de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM.



**Figura 3:** Criança com sinal de Romoña (também conhecido como chagoma de inoculação). Imagem de Torrico & Castro, 2002.

*T. cruzi* tem habilidade de invadir e se multiplicar em diferentes tipos celulares do hospedeiro, incluindo macrófagos, miócitos lisos e estriados, fibroblastos e até neurônios, onde logo se transformam em formas amastigotas e se reproduzem formando os ninhos parasitários (Andrade & Andrews, 2005). Após um período de 3 a 5 dias, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas. Durante o ciclo evolutivo do *T. cruzi*, o ninho de parasitos rompe a célula parasitada, liberando no interstício as formas íntegras ou degeneradas do parasito e restos da célula hospedeira, os quais atuando como imunógenos e/ou mediadores químicos, desencadeiam uma resposta inflamatória mononuclear focal. Até duas semanas após a infecção pode ser detectado no soro de paciente a presença de complexos imunes, decréscimo dos níveis de C3, além de necrose no foco inflamatório. O processo inflamatório severo é usualmente acompanhado por necrose de células parasitadas e não parasitadas, especialmente no coração. Em modelo animal foi possível associar os danos no miocárdio seguidos de prolongados períodos de isquemia, a uma incompatibilidade entre a perda de integridade microvascular e necrose dos miócitos, resultando em áreas de morte celular. Irreversivelmente, os danos no miocárdio são

geralmente proporcionais à extensão e severidade da necrose miocelular (Dourado et al., 2003).

Como sintoma geral e de aparecimento precoce destaca-se a febre, acompanhada de mal-estar geral, cefaléia, astenia e hiporexia. De observação freqüente, a febre é geralmente pouco elevada, oscilando em torno de 38°C; porém em crianças, às vezes, é mais alta. Relacionada com o grau de parasitemia e de regra, com a gravidade da infecção.

“Não há um tipo característico de febre, podendo ser registrados o intermitente quotidiano e o remitente, com elevações vespertinas apreciáveis, bem como contínuo, sendo de assinalar que, na maioria dos casos, ocorre sucessão irregular desses tipos” (Chagas, 1916).

Os portadores da fase aguda podem vir a falecer de insuficiência cardíaca e/ou arritmia (miocardite) ou de meningoencefalite.

A respeito da anatomopatologia, a miocardite é a lesão mais constante, e é muito intensa mesmo naqueles pacientes que, em vida, mostram apenas sinais escassos de envolvimento cardíaco ou, nas necropsias, mostram corações sem alterações macroscópicas evidentes. Os que falecem de insuficiência cardíaca mostram um coração flácido, congesto, moderadamente aumentado de volume, mais por dilatação do que por hipertrofia, e com petéquias ou sufusões hemorrágicas, subepicárdicas e subendocárdicas. As trombozes intracardíacas são excepcionais. Na emergência dos grandes vasos pode ser encontrado um linfonodo aumentado de volume, representando um processo de linfadenite inespecífica (Parra et al., 1976).

## 2.3.2 Fase crônica

### 2.3.2.1 Forma crônica indeterminada

Esta forma caracteriza-se pelo paciente infectado pelo agente etiológico, nos quais não são detectadas anormalidades clínicas, ou seja, o paciente apresenta ausência de sintomatologia característica da doença (Laranja, 1953; revisado por Marin-Neto et al., 2003). Ela é definida por uma combinação de soropositividade ao *T. cruzi*, uma radiografia do torax e eletrocardiograma normais, enema de bário normal e a falta de sinais clínicos e sintomas (Prata, 2001), porém alguns pacientes possuem lesões cardíacas. Em um estudo com 505 pacientes na fase indeterminada, 13,8% apresentaram lesões cardíacas segmentares na ecografia bidimensional (Viotti et al., 2004).

A fase indeterminada da doença tem sido ligada a casos de morte súbita (revisado por Carod-Artal, 2007; revisado por Bestetti & Cardinali-Neto, 2008). Através das evidências disponíveis, de acordo com o foco epidemiológico, conclui-se que a forma indeterminada da doença de Chagas se associa a excelente prognóstico, onde a mortalidade relatada à doença nesses estudos variou de 0 a 2,5% dos casos de seguimento de até 10 anos (Dias & Kloetzel, 1968; Macedo, 1980; Coura et al., 1985; Dias, 1985).

Em dois terços dos pacientes com a fase indeterminada a doença não progride, mas no terço restante ela se torna sintomática (Coura et al. 1985; Pompilio et al., 2006). Em pacientes com a forma sintomática da doença, dois terços desenvolvem a forma cardíaca e

um terço desenvolve a forma gastrointestinal. A progressão da forma indeterminada para a forma sintomática pode levar anos ou até mesmo décadas (Pereira et al., 1990).

Desta forma, com o avanço de metodologias mais sensíveis para a identificação de lesões cardíacas, o desafio será identificar fatores de risco para a progressão da cardiopatia chagásica crônica, em pacientes na forma indeterminada da doença de Chagas. Contudo ao nosso entendimento, nenhum determinante de progressão da forma assintomática para a forma sintomática foi ainda identificado (revisado por Lescure et al., 2010).

#### 2.3.2.2 Forma crônica cardíaca

A cardiopatia chagásica crônica se constitui na forma clínica mais freqüente resultante da infecção pelo *T. cruzi* e é responsável pela elevada morbidade e mortalidade da doença. Cerca de 30% a 50% dos indivíduos soropositivos desenvolvem alguma forma de expressão de doença crônica cardíaca; e em cerca de 30% desses, as manifestações serão significativas, associando-se a eminente morbidade e mortalidade (revisado por Muñoz-Saravia, 2010).

Caracterizada do ponto de vista histopatológico por uma miocardite crônica fibrosante de evolução lentamente progressiva e variável, apresenta, como manifestações clínicas principais as bradi e taquiarritmias, os fenômenos trombo-embólicos, sistêmicos e pulmonares e a insuficiência cardíaca. A extensão do acometimento miocárdico (traduzida por moderado a grave comprometimento da função sistólica global) e a presença de arritmias ventriculares complexas se constituem nos principais determinantes prognósticos da doença. (revisado por Muñoz-Saravia, 2010).

Em pacientes acompanhados durante estudo longitudinal desenvolvido no IPEC/Fiocruz em uma coorte urbana de 604 pacientes com doença de Chagas, foi possível demonstrar as seguintes frequências (pacientes/ano) para as manifestações da cardiopatia chagásica crônica: insuficiência cardíaca (8,9%), bradiarritmias necessitando de marca-passo definitivo (2,5/100); taquiarritmias supraventriculares sustentadas (8,5%); taquicardia ventricular sustentada: (1,0%) e acidente vascular encefálico, presumivelmente embólico (3,6%) (Xavier, 1999). A mortalidade anual neste subgrupo de pacientes com acometimento miocárdico extenso foi de 11%, e os mecanismos de óbito mais frequentes foram a morte súbita (70%), seguido pela morte por insuficiência cardíaca (26%) e mais raramente, secundária à evento embólico (4%).

A elevada morbimortalidade deste grupo de pacientes contrasta com o bom prognóstico dos indivíduos com função ventricular preservada ou apenas levemente deprimida, que apresentam uma probabilidade de sobrevida em 5 anos, estimada neste estudo em 99,8%, mesmo entre os pacientes com eletrocardiogramas alterados (Xavier et al., 2005, Siciliano et al., 2006).

### 2.3.2.3 Forma crônica digestiva

Esta forma está presente, sobretudo, nas regiões abaixo da linha equatorial, com a esofagopatia ocorrendo, no Brasil, em aproximadamente 7 a 11% dos pacientes em áreas endêmicas, e a colopatia em 1 a 7%, sendo muito mais baixas as taxas de prevalência de outras alterações digestivas, como dispepsia chagásica de estômago, duodeno, etc (Coura et al., 1985; Meneghelli, 2004). Há registros da ocorrência de formas digestivas da

doença de Chagas na maioria dos países (Argentina, Uruguai, Chile, Paraguai, Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru, Equador, Costa Rica, Honduras, Guatemala e México), não havendo detecção no Panamá e apenas relato de casos muito esporádicos na Venezuela. Historicamente, essa afecção tem registros muito antigos, remontando ao século XVIII, em São Paulo e no Nordeste, sendo considerado um excelente marcador de ocorrência da doença de Chagas (Dias & Coura, 1997).

Como na cardiopatia chagásica crônica a maioria dos chagásicos com formas digestivas evolui lentamente. Nas áreas endêmicas, observa-se que cerca de 70% dos pacientes com esôfago ou colopatia estão nos estágios iniciais (anectásicos ou com megaviscera inicial) da evolução, não se sabendo se o tratamento específico pode sustá-la ou retardá-la.

A esofagopatia chagásica apresenta uma correlação com carcinomatose de esôfago em cerca de 2% a 4% dos casos, muito acima da população geral não chagásica, que não chega a 0,3%; o megaesôfago pode ainda complicar-se com pneumonia aspirativa, desnutrição, esofagite de refluxo e ruptura do órgão (de Rezende et al., 1985).

O megacólon aparece mais tardiamente e apresenta maior dificuldade no estabelecimento de sua prevalência. A colopatia é a mais tardia das formas crônicas da doença de Chagas, aparecendo quase sempre depois dos trinta anos de idade (de Rezende, 1985). Pelo aparecimento tardio e também por seu substrato fisiopatológico, a colopatia chagásica crônica se encontra quase sempre associada à cardiopatia e à esofagopatia (mais de 50% dos casos); naturalmente, os graus mais avançados da colopatia se associam com grupos etários mais elevados (Meneghelli et al., 1985).

## 2.4 EVOLUÇÃO E PROGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

O prognóstico para a doença de Chagas depende da forma clínica e das complicações durante sua evolução. Durante a fase aguda, as manifestações dependem da idade do paciente e da intensidade e localização das lesões. Em geral, a fase aguda é muito grave entre crianças menores de 2 anos, e é quase sempre fatal entre aqueles com miocardite, insuficiência cardíaca e meningoencefalites. O prognóstico também pode ser muito pobre em casos de forma congênita, levando não só ao aborto e à prematuridade, mas também às lesões orgânicas no fígado, baço, coração e sistema nervoso central, com seqüelas neurológicas e deficiência mental. Muitos casos podem ser assintomáticos e permanecem na forma indeterminada.

Na forma cardíaca crônica, o prognóstico varia consideravelmente de caso para caso. Pacientes com lesões mínimas, como bloqueio de ramo direito isolado ou auricular ou unifocal extra-sístoles ventriculares, tendem a permanecer estáveis e sobrevivem por longos períodos e muitas vezes morrem devido a outras causas. Pacientes com arritmias complexas, extra-sístoles multifocal, taquicardia paroxística, fibrilação auricular, bloqueio atrioventricular total ou insuficiência cardíaca têm um prognóstico muito pobre. Um terceiro grupo de pacientes com área cardíaca discretamente aumentada, mutabilidade eletrocardiográfica e manifestações clínicas tem um prognóstico incerto (Nogueira & Coura, 1990; Rassi-Jr et al., 2005).

Com o controle da transmissão, o foco de atenção hoje na doença de Chagas está voltado para o grande contingente de pacientes já infectados pelo *T. cruzi*, do qual uma parcela significativa irá desenvolver a cardiopatia chagásica crônica, forma clínica determinada mais freqüente e responsável pela elevada morbimortalidade da doença.

Como identificar os indivíduos em risco de desenvolverem as formas mais graves da doença e como interferir neste processo constitui hoje no grande desafio e no objetivo prioritário de pesquisa em doença de Chagas.

A progressão para as formas mais graves da doença pode assim, estar diretamente relacionada a fatores relacionados ao parasita e à interação parasito-hospedeiro, incluindo o “background” genético de ambos. A mobilização do sistema imune é importante na redução da carga parasitária, mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas observadas em alguns pacientes. Entender as diferenças da resposta imune que estão implicadas em maior ou menor agressão tecidual é o grande desafio para o entendimento da patofisiologia da doença de Chagas.

Recentemente uma grande perspectiva tem sido apontada quanto às alterações genótípicas que possam estar associadas ao desenvolvimento de quadro graves da cardiopatia chagásica crônica. Contudo, há poucos relatos quanto à presença de genes relacionados à susceptibilidade na doença de Chagas.

## 2.5 RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS

Apesar do fato que a resposta imune adaptativa ter sido considerada, por décadas, como o principal mecanismo protetor durante a infecção crônica da doença de Chagas (Dutra et al., 1994; Lemos et al., 1998; Gomes et al., 2003, de Barros-Mazon et al., 2004; Souza et al., 2004, Gomes et al. 2005), estudos recentes sugerem a importância da resposta imune inata como um mecanismo regulatório importante para o controle da morbidade durante a fase crônica da doença (Vitelli-Avelar et al., 2005).

Os parasitos depositados na pele ou feridas na mucosa estimulam uma reação inflamatória local (chagoma de inoculação ou sinal de Romaña), com uma resposta linforreticular. Os tripomastigotas circulantes fagocitados por macrófagos são transportadas para o fígado, gânglios, baço, órgãos linfáticos, músculos esqueléticos e para o coração, formando pseudocistos de amastigotas. O reconhecimento inato de patógenos intracelulares como o *T. cruzi* pode ser feito através de pelo menos três níveis de controle de infecção: 1- detecção e destruição direta dos parasitas através da imunidade inata, em particular macrófagos e células dendríticas; 2- ativação de células dendríticas e macrófagos para se tornarem potentes apresentadores de antígenos e potentes ativadores da resposta imune adaptativa apropriada; 3- detecção da infecção por células não hematopoiéticas que são os primeiros alvos na invasão pelo *T. cruzi* (Tarleton, 2007).

A resposta imune inata possui um papel essencial no reconhecimento da infecção pelo *T. cruzi* e subsequentemente desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Kayama & Takeda, 2010). Componentes clássicos da imunidade inata, como células dendríticas, macrófagos e células assassinas naturais (NK, do inglês *Natural Killer*) parecem ter papel crucial na imunidade anti-*T. cruzi* (revisado por Junqueira et al., 2010). Diferentes moléculas

de superfície do parasito têm sido identificadas como indutoras da imunidade inata, dentre elas destacam-se as âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), as GPI ligadas covalentemente às glicoproteínas semelhantes a mucinas, as GPI-mucinas e a enzima trans-sialidase (TS) (revisado por Gazzinelli & Denkers, 2006).

No sistema imune inato, uma classe de receptores de reconhecimento de padrão (os PRRs) são expressos nas células apresentadoras de antígenos (APC), macrófagos e células dendríticas, que reconhecem estruturas denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (os PAMPs) (Hoffmann et al., 1999; Tarleton, 2007). Dentre os diversos PRRs, os receptores tipo Toll (TLR) são os mais estudados. Diversos estudos vêm demonstrando o envolvimento dos TLRs na infecção pelo *T. cruzi*. De fato, na infecção experimental por este agente, Campos et al. (2001) observaram que os macrófagos de camundongos deficientes de TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>) não produziam citocinas pró-inflamatórias após estimulação com GPI. A ativação das APCs via TLRs 2, 4, 6 e 9 desencadeia a fosforilação das MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) levando à indução de genes de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e Interleucina 12 (IL-12), controlando a replicação do parasito (Akira et al., 2001; Akira & Takeda, 2004).

Na infecção pelo *T. cruzi*, as células da imunidade inata possuem um papel importante na supressão da replicação e propagação do parasita nos tecidos, através da indução de mediadores pro-inflamatórios como a IL-12, TNF- $\alpha$  e NO (óxido nítrico), contribuindo para a parasitemia e mortalidade do parasito em camundongos infectados experimentalmente pelo *T. cruzi* (revisado por Kayama & Takeda, 2010). A IL-12 é o principal mediador da produção de IFN- $\gamma$  através da indução do desenvolvimento de células Th1 e da ativação de células NK. Em macrófagos, o IFN- $\gamma$  induz a expressão do óxido nítrico sintase (NOS2), responsável pela síntese de NO. Este último é produzido por macrófagos ativados e é citotóxico ou citostático para microrganismos intracelulares (Vespa et al., 1994). Durante a infecção intracelular do parasita essas moléculas são coordenadas para iniciar

uma resposta imune objetivando controlar a replicação do parasita. Com isso, uma alta susceptibilidade ao *T. cruzi* tem sido demonstrada em camundongos deficientes em IL-12, IFN- $\gamma$ , NOS2 (Holscher et al., 1998; Graefe et al., 2003).

Os primeiros estudos relacionados à resposta imune adaptativa dos pacientes chagásicos focalizaram-se na resposta humoral. A detecção de anticorpos reativos ao parasita foi e é uma importante ferramenta para diagnóstico da infecção em humanos e, diante dessa associação, pesquisas têm sido realizadas para melhor caracterizar a resposta humoral dos pacientes chagásicos crônicos. Foram encontrados no soro de pacientes crônicos anticorpos reativos a epitopos de galactose e que podem mediar a lise de formas tripomastigotas. Esses anticorpos foram denominados “anticorpos líticos”. Estudos recentes mostraram que os anticorpos líticos são encontrados em níveis mais elevados no soro de pacientes com a forma indeterminada do que a forma cardíaca da doença, sugerindo um papel protetor para esses anticorpos (Reis et al., 1993; Cordeiro et al., 2001). Foi demonstrado que citocinas Th1 (IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) são responsáveis pela produção dos isotipos IgG1 e IgG3, enquanto citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-10) estimulam a produção do isotipo IgG2 (Briere et al., 1994; Kawano et al., 1994). A IgG1 medeia a lise de ligação da proteína do complemento C1q e a fagocitose de macrófagos, enquanto IgG2 medeia a imunidade através de células efectoras não fagocíticas (Fanger et al., 1991). Muitos autores tentaram demonstrar a correlação entre os isotipos de IgG e a severidade das diferentes formas clínicas da doença de Chagas em pacientes infectados (Cerban et al., 1993; Morgan et al., 1996; Zauza & Borges-Pereira, 2001; Michailowsky et al., 2003; Verçosa et al., 2007), e em modelos experimentais (Giordanengo et al., 2000; Guedes et al., 2008). Por outro lado, alguns estudos não detectaram diferenças entre os níveis dessas imunoglobulinas (IgG) entre indivíduos com diferentes manifestações clínicas (Cerban et al., 1993; Cordeiro et al., 2001; Michailowsky et al., 2003). Contraditoriamente, outros autores encontraram altos níveis de IgG2 no soro dos pacientes com formas cardíaca e digestiva da doença (Morgan et al., 1996; Cordeiro et al., 2001). Verçosa et al., (2007) encontraram diferença estatística

nos anticorpos específicos do isotipo IgG2 em pacientes cardíacos quando comparados com pacientes indeterminados, sugerindo que este isotipo possa ser utilizado com a finalidade de prognóstico para o monitoramento a progressão para a doença de Chagas e para prever sobre os riscos dos danos cardíacos.

A secreção de citocinas do tipo Th1 (inflamatórias) e das citocinas do tipo Th2 (anti-inflamatórias) na doença de Chagas tem sido investigada por diferentes autores. Alguns estudos revelaram que, indivíduos na forma indeterminada da doença de Chagas, apresentaram monócitos/macrófagos alto produtores de IL-10 após exposição de tripomastigotas *in vitro*, enquanto os monócitos dos indivíduos na forma cardíaca produziram, preferencialmente, TNF- $\alpha$  (Gomes et al., 2005; Lorena et al., 2010).

A destruição tecidual observada em pacientes chagásicos crônicos está associada à presença de um infiltrado inflamatório, e este fato contribuiu para que a maioria dos estudos imunológicos se focalizassem na resposta celular. Com o desmembramento do pseudocisto no miocárdio ocorre a miocardite aguda. Esta é mediada por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e interleucinas, principalmente IL-2 e IL-4. A reação inflamatória leva a destruição das células musculares e dos neurônios, e é mantida pela presença do *T. cruzi* ou fragmentos de DNA do parasita, com uma reação de hipersensibilidade tardia, dilatação da microcirculação e fibrose, induzindo cardiomiopatia dilatada crônica, arritmias, disperiastase, megaesôfago e megacólon (Higuchi, 1999; Andrade, 1999; revisto por Coura, 2007).

O papel das células T reguladoras na doença de Chagas está sendo investigado e, estudos sugerem que indivíduos na forma indeterminada produzem uma maior concentração dessas células e, portanto, são capazes de controlar os efeitos deletérios da atividade citotóxica através da inibição da ativação de células CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> (Vitelli-Avelar et al., 2005). Da mesma forma, Araujo et al. (2007) mostraram que os indivíduos na forma indeterminada têm níveis mais elevados de células T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) expressando FoxP3 e IL-10 comparados com indivíduos cardiopatia chagásica crônica.

A redução de células *naive* e o aumento das células T de memória podem ocorrer durante a fase crônica da doença, e isto pode indicar uma exaustão da célula T clonal devido a estimulação contínua de parasitas persistentes, o que pode estar associado com o aumento da severidade da doença (d'Imperio et al., 1986; Minoprio et al., 1986; Dutra et al., 1994). Fiuza et al. (2009), avaliaram o perfil de memória de linfócitos periféricos CD4 e CD8, bem como a secreção das citocinas antes e depois de estimulação *in vitro* através da avaliação da resposta celular de pacientes não-infectados, pacientes na forma indeterminada e na forma cardíaca da doença, e concluíram que pacientes com a forma cardíaca possuem mais células TCD8 *naive* secretando IFN- $\gamma$  e células TCD8 de memória efetora que os pacientes indeterminados e os não-infectados, indicando que células T de memória podem estar envolvidas na indução do desenvolvimento de uma forma severa da doença de Chagas através de mecanismos modulados pelo IFN- $\gamma$ .

### 2.5.1 Interferon-gama e a doença de Chagas

Os Interferons (IFN) constituem uma família de proteínas que foram caracterizadas de acordo com as bases bioquímicas-, biológicas e propriedades antigênicas (Trent et al., 1982; Naylor et al., 1983). De acordo com essas características eles foram classificados em: IFN- $\alpha$  que corresponde ao IFN do leucócito ou LeIF; IFN- $\beta$  correspondente ao IFN do fibroblasto ou também chamado de FIF; e IFN- $\gamma$  que é o IFN imunológico (Trent et al., 1982). As estruturas das proteínas dos IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  são similares e são reconhecidas pelo mesmo receptor. Ambos os genes para IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  estão localizados no braço curto do cromossomo 9 e não possuem íntrons (Owerbach et al., 1981;

Shows et al., 1982). Diferentemente dos IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , o IFN- $\gamma$  não é homólogo aos outros tipos de IFNs e possui um único gene que contém 3 íntrons. O IFN- $\gamma$  foi o último a ser clonado (Gray et al., 1982), e este não possui nenhuma homologia nas seqüências de nucleotídeos quando comparado com os outros tipos de IFNs; o que leva a crer que o IFN- $\gamma$  seja provavelmente produto de um único gene (Derynck et al., 1982; Gray & Goeddel, 1982; Gray et al., 1982).

A secreção de IFN- $\gamma$  parece estar associada com forma severa da cardiopatia chagásica crônica, demonstrada pelos altos níveis de IFN- $\gamma$  secretado após estímulo *in vitro* de células monocleares periféricas com antígenos parasitários brutos. A secreção de IL-10 por sua vez, pode estar associada ao controle das lesões miocárdicas e a morbidade, pois se encontra elevado em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas (Bahia-Oliveira et al., 1998; revisado por Correia-Oliveira et al., 1999), sendo linfócitos T CD4 as células produtoras desta citocina (Gomes et al., 2003). De modo interessante, níveis de IFN- $\gamma$  parecem não diminuir após a cura parasitológica em pacientes tratados com benzonidazol (Bahia-Oliveira et al., 1998 e Correia-Oliveira et al., 1999, revisão). Desta forma, IFN- $\gamma$  estaria envolvido em ampliar o efeito citotóxico de células TCD8<sup>+</sup> (Reis et al., 1997), predominante nos infiltrados inflamatórios cardíacos (Higuchi et al., 1993). IFN- $\gamma$  está também presente nas lesões miocárdicas (Reis et al., 1997; Cunha-Neto et al., 1998). Gomes et al. (2005) descreveram uma predominância de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> co-expressando CCR5 e/ou CXCR3 (marcadores de células Th1) e IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  em pacientes com cardiopatia chagásica crônica do que em pacientes com a forma indeterminada, que expressaram maior percentual de células CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> co-expressando CCR3 (marcador de células Th2) e IL-10 ou IL-4. Recentemente Lorena e colaboradores (2010) demonstraram que pacientes com cardiopatia dilatada (CARD 2) baseado na classificação da Associação do Coração de Nova York apresentaram um número maior de células T CD8<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  do que em pacientes com cardiopatia chagásica não dilatada (CARD 1) e aqueles na forma indeterminada, após estímulo com antígeno

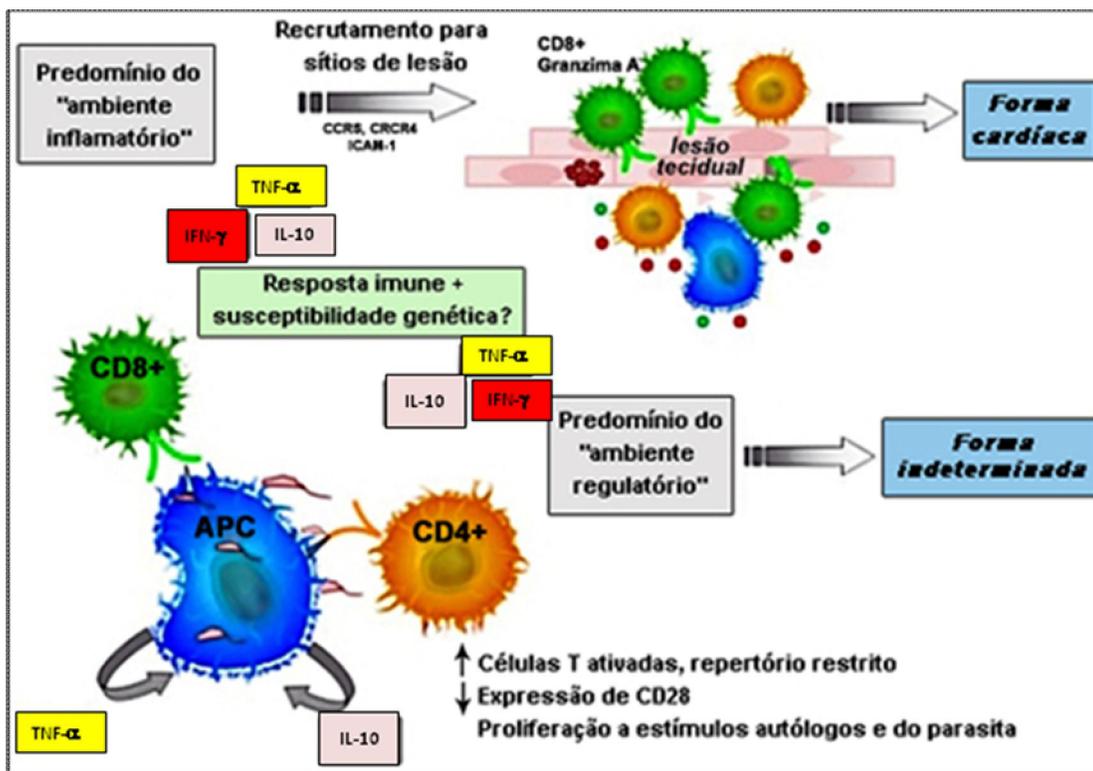
citoplasmático repetitivo (CRA). De modo interessante o número de monócitos (cerca de 1,0 a 1,5%) secretores de IFN- $\gamma$  estava também presente em todos os grupos (CARD 1, 2 e IND) (figura 4).

Outros autores (Abel et. al., 2001) descrevem a presença marcante de altos níveis de IFN- $\gamma$  produzidos por células periféricas de pacientes com cardiopatia chagásica crônica após estímulo com a proteína B13 do *T. cruzi*. Neste estudo linhagens de células inflamatórias cardíacas de pacientes com cardiopatia chagásica crônica também foram capazes de secretarem elevados níveis de IFN- $\gamma$  após estímulo com PHA.

Contudo, outros autores vêm descrevendo papel benéfico para o IFN- $\gamma$  durante a evolução da cardiopatia chagásica crônica. Assim, Ribeirão et al. (2000) em um grupo pequeno de pacientes (n=28), descreveram não haver associação aos níveis elevados de IFN- $\gamma$  produzido após estímulo com a proteína recombinante trans-sialidase em pacientes com diferentes formas clínicas, embora não tenham descrito como foi realizada a classificação clínica dos pacientes estudados. Da mesma forma, após estímulo com peptídeos sintéticos derivados de proteínas do *T. cruzi*, foi possível identificar uma alta frequência de respondedores entre os pacientes com forma mais branda da cardiopatia chagásica crônica (Grupo 1 da classificação da Associação do Coração de Nova York) e baixa frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  em pacientes com a forma mais severa da cardiopatia chagásica crônica. Laucella et al., (2004), sendo então sugerido pelos autores que a frequência da produção de IFN- $\gamma$  pelas células T de pacientes com a cardiopatia chagásica crônica esteja associada com a histórico de exposição recente. Infelizmente estes autores não discutem o tempo de exposição e/ou doença para a casuística estudada. Em estudo recente endereçado para a detecção de múltiplas citocinas, Vitelli-Avelar et al., (2008) descreveram que pacientes com cardiopatia

chagásica crônica são produtores de citocinas predominantemente regulatórias, enquanto pacientes na forma indeterminada produzem citocinas inflamatórias. No entanto, apesar do percentual de células produtoras de IFN- $\gamma$  terem sido mais representativo em pacientes com cardiopatia chagásica crônica, sendo estas T CD8<sup>+</sup>, não há em geral aumento de células produtoras de IFN- $\gamma$  em relação aos indivíduos saudáveis.

A resposta imune montada durante a fase inicial da infecção por *T. cruzi* pode influenciar o desenvolvimento da cardiopatia a curto ou longo prazo e em intensidade variável. Apesar do papel do IFN- $\gamma$  ainda permanecer dúvida, se protetor na fase aguda e indeterminada e/ou deletério na fase crônica cardíaca, vários fatores como a carga parasitária, as cepas do *T. cruzi* e a genética do hospedeiro podem também ser de igual importância.

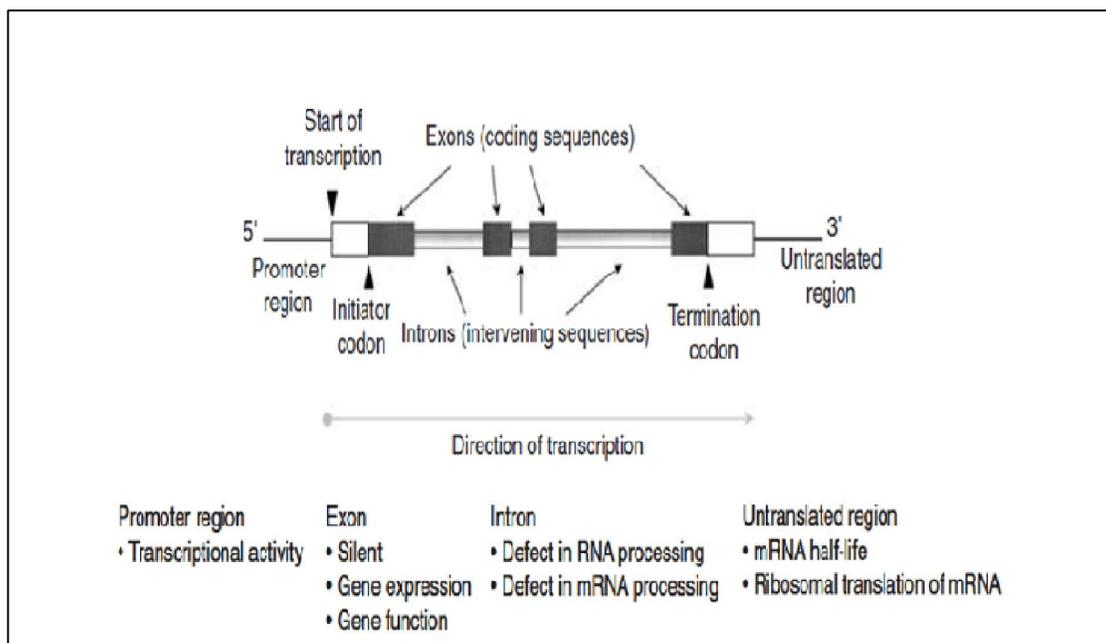


**Figura 4:** Representação da resposta imune de pacientes chagásicos com as formas indeterminada e cardíaca, embora muitos conhecimentos tenham sido adquiridos em relação à resposta imune de pacientes chagásicos, importantes aspectos ainda não foram esclarecidos.

<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=163>

## 2.6 POLIMORFISMOS

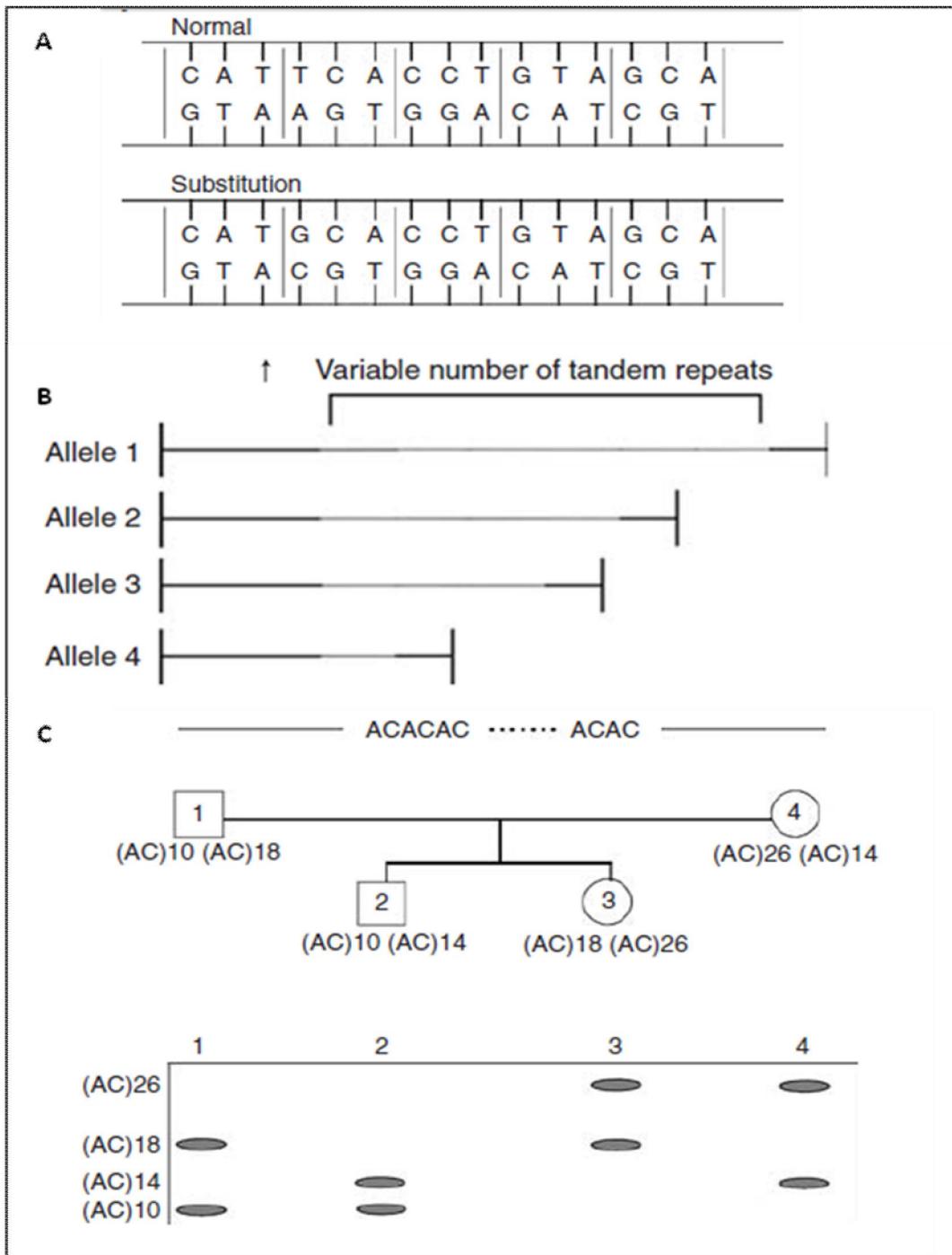
Polimorfismos são variantes genéticas presentes nos genes representando 0,1% e são marcadores da diversidade biológica e, algumas variações genotípicas têm correlação com o fenótipo específico relevante em doenças humanas (Haukim, 2002; Bidwell, 2008). Os polimorfismos em genes humanos podem ser observados em um ou mais de um dos seguintes sítios: no promotor ou na região 5' flanqueadora; no(s) exon(s) ou no gene que codifica a seqüência; no(s) íntron(s) ou na região não traduzida 3' (3'UTR) (figura 5).



**Figura 5:** Estrutura de um gene humano, sítios de polimorfismos e relevância funcional. Jaber, 2004.

O polimorfismo envolvendo a região promotora 5' do gene podem afetar a atividade de transcrição e podem ser de relevância funcional (Thompson & Thompson, 2001). Polimorfismos na região codificante ou no éxon podem ser silenciosos ou afetarem a expressão ou função resultando em mudanças na estrutura, na ligação ou no tráfego da

proteína. Os íntrons são transcritos em RNA, porém são cortados do RNA mensageiro (mRNA), antes de serem traduzidos em proteína; conseqüentemente, polimorfismos envolvendo íntrons podem levar a erros no processamento do RNA e mRNA. Finalmente, polimorfismos na região 3'UTR podem afetar a expressão do gene afetando a meia vida do RNA ou influenciando a tradução ribossomal do mRNA (Van Deventer, 2000). Três tipos de polimorfismos genéticos em humanos foram descritos: 1- Polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP): é a classe mais comum e normal consistindo na substituição de um único polimorfismo (Figura 6a). Um SNP na região promotora pode influenciar a ligação do fator de transcrição ou outros aspectos da expressão do gene; 2- número variável de repetições Tandem (VNTR) ou polimorfismo em minissatélite; resultam da interseção no conjunto de múltiplas cópias de uma seqüência de nucleotídeos de menos de 100 bp de comprimento, conhecida como minissatélite, entre dois sítios de restrição. Esta classe de polimorfismo caracteriza-se por vários alelos, com base no número de cópias de minissatellite (Thompson & Thompson) (Figura 6b) e 3- polimorfismo Microsatélite: são seqüências do DNA com uma pequena modificação em que um dos cinco nucleotídeos é repetido muitas vezes. Uma repetição de adenina e citosina (CA) é a forma mais comum descrita. Microsatélites mostram diferenças hereditárias e estáveis entre indivíduos (Figura 6c)



**Figura 6:** Tipos de polimorfismos gênicos: A: Polimorfismo de único nucleotídeo; B: Número variável de repetições tandem ou repetições de minissatélites *loci*; C: Microsatélites *loci* polimorfismos (sequência de DNA de unidades repetitivas de 2 a 4 nucleotídeos)

### 2.6.1 Polimorfismos no *IFNG*

O IFN- $\gamma$  é uma citocina multifuncional produzida por células T efetoras e células NK. Ele controla o desenvolvimento de células T helper 1 (Th1), sendo estas fundamentais para a defesa do hospedeiro contra uma variedade de patógenos intracelulares, incluindo a infecção pelo *T. cruzi* (Torrico et al, 1991; Silva et al, 1992; Torres et al., 2010). O gene que codifica o IFN- $\gamma$  em humanos se localiza no cromossomo 12q24.1, mede 5.4kb e contém éxons que codificam uma proteína de 146 aa. Vários polimorfismos de *IFNG* nas regiões não codificantes são descritos. A repetição do microssatélite CA na posição -179T/G tem sido implicada em numerosas doenças auto-imunes e condições inflamatórias crônicas (Pravica et al, 2000; Chong et al. 2006; Pacheco et al, 2008). Um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), localizado no primeiro íntron do gene de *IFNG* em humanos, junto a uma região de repetição CA (+874T/A polimorfismo rs2430561) pode influenciar a secreção deste (Pravica et al., 2000).

Várias infecções virais, bacterianas e parasitárias estão associadas a variações no SNP +874T/A. A susceptibilidade à doenças infecciosas como a síndrome respiratória aguda severa (SARS) (Chong et al., 2006), hepatite B (Cheong et al 2006; Ribeiro et al 2007), câncer cervical (HPV) (Gangwar et al 2009), tuberculose (Vallinoto et al., 2010), toxoplasmose (Albuquerque et al., 2009) estão associadas a este polimorfismo.

Contudo, o polimorfismo do SNP na posição +874T/A podem não estar associados a outras doenças e infecções como pancreatite crônica (Bendicho et al., 2005), leishmaniose (Matos et al., 2007), tuberculose (Moran et al., 2007) e hepatite C (Pereira et al., 2008).

Por outro lado, doenças auto-imunes também podem ter sua ligação com o SNP +874T/A. Estudo envolvendo Lupus Eritrematoso Sistêmico na população Tailandesa demonstrou que a frequência alélica do polimorfismos no gene de *IFNG* (+874T/A) entre pacientes portadores de Lupus e pacientes controles (sem Lupus) não foram significamente diferentes. Entretanto, uma associação significativa ocorreu entre o alelo A no grupo dos

pacientes portadores de Lupus e artrite, sugerindo que este polimorfismo possa ser usado como marcador para pacientes com Lupus e susceptibilidade a artrite na população Tailandesa (Tangwattanachuleeporn et al., 2007).

Recentemente, Torres et al., (2010) analisaram a distribuição de alelos e genótipos no polimorfismo de *IFNG* (+874T/A) entre pacientes cardíacos e assintomáticos com doença de Chagas na população Colombiana e não observaram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos indicando que este polimorfismo não possui influência na progressão da doença de Chagas. Contudo, ao analisar pacientes soropositivos e soro-negativos para *T. cruzi*, os mesmos autores evidenciaram forte associação, sendo o genótipo AA mais freqüente nos pacientes chagásicos, indicando ser este SNP associado a susceptibilidade a doença.

O papel do polimorfismo no *IFNG* na susceptibilidade para a doença de Chagas e na progressão da cardiopatia chagásica crônica em nossa população ainda merece investigações. Desta forma objetivando a identificação do papel do SNP na posição +874T/A na evolução da cardiopatia chagásica, incluímos pacientes com vários graus de acometimento cardíaco, indivíduos assintomáticos e soro-negativos para *T. cruzi*.

### 3 OBJETIVOS

3.1. Identificar a frequência dos genótipos e alelos para o SNP no *IFNG* na posição +874T/A em pacientes soropositivos para o *T. cruzi* apresentando ou não a cardiopatia chagásica crônica e em indivíduos sadios soro-negativos para o *T. cruzi*.

3.2. Associar a presença dos genótipos e alelos para o SNP no *IFNG* na posição +874T/A à susceptibilidade à infecção, comparando pacientes soro-positivos para o *T. cruzi* e indivíduos sadios soro-negativos para o *T. cruzi*.

3.3. Associar a ocorrência ao adoecimento em indivíduos apresentando ou não a cardiopatia chagásica crônica.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL E CASUÍSTICA

Neste estudo, foram incluídos pacientes com doença de Chagas na forma cardíaca e indivíduos sem cardiopatia aparente, além de indivíduos soronegativos para o *T. cruzi*. O projeto denominado “Identificação de marcadores imunogenéticos na evolução clínica para a doença de Chagas foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)/Fiocruz (anexo A).

Os pacientes incluídos neste estudo foram selecionados da coorte do Laboratório de Doença de Chagas do IPEC/-Fiocruz. A seleção dos mesmos foi realizada pelos médicos cardiologistas Sérgio Salles Xavier e Marcelo Teixeira de Holanda e o infectologista Gécio de Alvarenga Filho. Todos os voluntários apresentavam soropositividade para *T. cruzi*.

Após aceitarem participar no estudo e assinarem o Termo de consentimento Livre e esclarecido (TCLE), um questionário clínico - epidemiológico foi respondido (anexos B e C). Os pacientes que aceitaram participar foram incluídos prospectivamente, entretanto análises retrospectivas foram realizadas para assegurar o perfil clínico no momento da inclusão.

#### 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos pacientes com doença de Chagas, de ambos os sexos com diagnóstico sorológico e clínico compatível com a infecção por *T. cruzi*, maiores de 18 anos, independente de classe, grupo social ou cor; estes foram atendidos no Laboratório Clínico de Doença de Chagas do IPEC/Fiocruz e convidados a participar da presente proposta. Levou-se em consideração para a inclusão dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica a classificação clínica em estádios proposta pelo Consenso Brasileiro em Doença de Chagas em 2005 (Figura 7), onde pacientes são classificados de acordo com a presença de Eletrocardiograma e Ecocardiograma alterados e presença ou ausência de Insuficiência cardíaca.

<b>Estádios</b>	<b>Eletrocardiograma</b>	<b>Ecocardiograma</b>	<b>Insuficiência Cardíaca</b>
<b>A</b>	Alterado	Normal	Ausente
<b>B1</b>	Alterado	Alterado FEVE>45%	Ausente
<b>B2</b>	Alterado	Alterado FEVE<45%	Ausente
<b>C</b>	Alterado	Alterado	Compensável
<b>D</b>	Alterado	Alterado	Refratária

**Figura 7:** Estadiamento do comprometimento miocárdio na cardiopatia chagásica crônica.

Foram incluídos, também, indivíduos sadios não infectados por *T. cruzi*, não relatando prévio contato com área endêmica para a doença de Chagas e residentes do Município do Rio de Janeiro.

A casuística para este trabalho foi composta de três grupos de estudos: Os pacientes com sorologia positiva sem cardiopatia aparente; pacientes com sorologia positiva com cardiopatia chagásica crônica e indivíduos sadios com sorologia negativa para *T. cruzi*. Os indivíduos dos dois grupos com sorologia positiva para *T. cruzi* foram incluídos consecutivamente no período de 2007 a 2009, e estes foram provenientes do Laboratório de Pesquisa Clínica em doença de Chagas IPEC-Fiocruz. Assim, foram selecionados 188 pacientes, sendo que destes, 86 (44,3%) não apresentaram cardiopatia aparente e 102 (52,7%) apresentaram a forma cardíaca, sendo classificados de acordo com o Consenso Brasileiro em Chagas de 2005 em: 31 (16,0%) no grupo A, 40 (20,6%) no grupo B1, 6 (3,1%) no grupo B2, 16 (8,2%) no grupo C e 9 (4,6%) no grupo D.

#### 4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Foram excluídos indivíduos nas seguintes condições:

- Diabetes mellitus;
- Disfunção tireoidiana;
- Insuficiência renal;
- Doença pulmonar obstrutiva crônica
- Alcoolismo;
- Doença coronariana obstrutiva;
- Doença cardíaca reumática.

## 4.4 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE *IFNG*

### 4.4.1 Obtenção de amostras biológicas

Foi obtida uma única amostra de sangue no momento da inclusão dos pacientes com doença de Chagas. Cinco mL de sangue total em EDTA (Vacuntainer) foram aliquotados e armazenados em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso para extração do DNA genômico.

### 4.4.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  da alíquota do sangue total em EDTA previamente descongelado. Utilizou-se o QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen). A metodologia utilizada para a extração do DNA genômico seguiu o protocolo descrito pelo fabricante: 20  $\mu\text{L}$  da proteinase Qiagen foi adicionada a um tubo de 1,5 mL tipo *ependorf*, previamente rotulado com o número da amostra. Adicionou-se a estes tubos, 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra de sangue, seguido de 200  $\mu\text{L}$  do tampão AL, do próprio Kit. Os tubos foram homogeneizados em vortex por 15 segundos. A amostra foi incubada a  $56^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e centrifugada a 10.000 rotações por minuto (rpm), (rapidamente, ou seja, logo que atingia a rotação de 10 000 rpm a operação era interrompida), o processo foi repetido por 3 vezes, para remover os possíveis resíduos da tampa. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol (96 a 100%,

Merck) e homogeneizado em vortex por 15 segundos. A amostra foi novamente centrifugada a 10.000 rpm, rapidamente, como anteriormente descrito, para remover os possíveis resíduos da tampa. A seguir, a amostra foi cuidadosamente transferida para a coluna QIAmp e a mesma centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi novamente transferida para outro tubo de 2 mL (incluso no kit), o filtrado descartado. Adicionou-se 500 µL do tampão AW1 (incluso no kit) e centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi transferida para outro tubo de 2 mL (incluso no kit) e o filtrado descartado. Adicionou-se 500 µL do tampão AW2 e centrifugou-se a 14.000 rpm por 3 minutos. A coluna QIAmp foi transferida para um *ependorf* de 1,5 mL (sem tampa) e o filtrado descartado. Adicionou-se 100 µL do tampão AE (do Kit), incubando-se a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto e então centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi descartada. O filtrado foi transferido para um *ependorf* de 1,5 mL e o DNA genômico foi acondicionado em freezer – 70°C.

Dez µL de cada amostra de DNA foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1%, em tampão TBE 1X, a 60 V, a fim de verificar a presença de banda única no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen). O DNA genômico foi corado em uma solução de Brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado em luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP).

### 4.4.3 Amplificação por PCR-ARMS

#### 4.2.2.1 Determinação do polimorfismo de *IFNG* +874T/A

Os polimorfismos foram determinados através da técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase). Para a determinação dos polimorfismos de *IFNG* +874T/A foi utilizada a técnica de ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System), descrita primeiramente por Newton *et. al.* (1989), como uma técnica para a análise de uma mutação pontual ou uma pequena deleção. O PCR ARMS típico que é capaz de detectar um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) consiste em duas reações complementares: uma contendo um *primer* específico para a seqüência normal do DNA e incapaz de amplificar o DNA mutante no *locus* e outro contendo um *primer* mutante específico que não amplifica o DNA normal. O genótipo de um indivíduo pode ser determinado pela análise da amplificação de seus produtos, onde o DNA genômico é amplificado a partir de uma Taq DNA polimerase (GoTaq® Polymerase (Promega, USA) em duas reações de PCR para cada polimorfismo. Cada reação ocorre com um *primer* antisense genérico e um de dois *primers* sensores alelo específicos. Como controle interno da amplificação em ambas as reações foi utilizado um par de *primers* desenhados a partir da seqüência nucleotídica do hormônio de crescimento humano de 426 bp. Nesta técnica para cada citocina é identificada a região que contém o polimorfismo e as bases nucleotídicas que sofrem mutação. No caso da citocina INF- $\gamma$  a mutação ocorre na região +874 e ocorre uma modificação nucleotídica de T para A que é determinada pelo código +874T/A. E o genótipo AA corresponde ao baixo produtor INF- $\gamma$ , o AT ao médio e por fim o genótipo TT ao alto produtor.

Para o polimorfismo de *IFNG* na posição +874T/A foram utilizados um *primer* genérico e dois *primers* específicos T e A de acordo com o protocolo descrito por Pravica et al., 2000:

Primer genérico: 5' – TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA – 3'

Primer específico T: 5'- TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT - 3'

Primer específico A: 5'- TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA - 3'

O primer iniciador utilizado para a amplificação do controle interno dessa citocina foi:

**CT11:** 5' - TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C - 3'

**CTI 2:** 5' - GCC TTC CAA CCATTC CCT TA - 3'

O fragmento do DNA genômico foi amplificado por PCR utilizando termociclador GeneAmp 9700 Applied Biosystem de acordo com protocolos previamente estabelecidos, seguindo o protocolo de Pravica et al. 2000 com volume final de 20  $\mu\text{L}$  (18,0  $\mu\text{L}$  *mix* + 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA genômico).

Para cada amostra de DNA foi preparado um mix contendo 1,0  $\mu\text{L}$  de *Primer* genérico (100 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 1,0  $\mu\text{L}$  de *primer* específico A ou T (100 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 1,0  $\mu\text{L}$  de controle interno 1 (10 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 1,0  $\mu\text{L}$  de controle interno 2 (10 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 4,0  $\mu\text{L}$  de dNTP (2 mM, Invitrogen), 2,4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM, Kit Hot Star Qiagen), 3,0  $\mu\text{L}$  de Tampão (10X, Kit Hot Star Qiagen), 0,5  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5U/  $\mu\text{L}$ , Kit Hot Star Qiagen), 4,1  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$

MiliQ estéril. O volume final do mix foi de 18,0  $\mu$ L sendo adicionado 2,0  $\mu$ L DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 20  $\mu$ L. A PCR foi realizada no Termociclador (Applied Biosystems). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 95°C (3 minutos), 10 ciclos de 95°C (15 segundos), 65°C (50 segundos) e 72°C (40 segundos) seguidos por 20 ciclos de 95°C (20 segundos), 55°C (50 segundos) e 72°C (50 segundos), 72°C (7 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

#### 4.2.2.2 Eletroforese em gel de agarose.

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Amersham) 1,5 %, utilizando TBE 1X. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O DNA foi corado em uma solução de brometo de etídio (10mg/mL) e visualizado em luz ultravioleta em transluminador. As imagens foram capturadas usando um sistema de captura de imagem (figura 7).



**Figura 8:** Ilustração do resultado do ARMS-PCR de IFN- $\gamma$  +874T/A.

#### 4.5.6 Análise estatística dos resultados

A frequência dos genótipos e alelos foi avaliada pela contagem de genes. Tabelas 2x2 foram construídas para determinar a significância estatística nas diferenças nas frequências dos alelos e genótipos utilizando o teste exato de Fisher ou prova do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) em indivíduos com perfil homocigotos e heterocigotos individuais para os polimorfismos SNPs nos indivíduos dos três grupos estudados. Foi utilizado o programa estatístico SPSS (*Statistical package for the social Science*) versão 16.0 para a determinação exata das frequências dos genótipos e alelos de todos os polimorfismos realizados neste estudo. A nossa casuística foi testada quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg sendo esta enquadrada dentro dos padrões de equilíbrio determinado pelo mesmo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CASUÍSTICA

A média de idade dos pacientes na fase indeterminada foi de 52,81 ( $\pm$  11,01) anos, sendo que destes 35 (40,7%) eram homens e 51 (59,3%) eram mulheres. No grupo dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica, a média de idade foi de 57,44 ( $\pm$  9,83) anos, apresentando 41 (40,2%) homens e 61 (59,8%) mulheres, como descritos na Tabela 1.

O estado de nascimento dos pacientes foi analisado, sendo que três Estados apresentaram maior frequência, sendo estes: Bahia (25,8%), Minas Gerais (25,8%) e Paraíba (11,9%), correspondendo a 63,5% da casuística. Foi questionado aos voluntários e levantado nos prontuários, o tempo de infecção pelo *T. cruzi*, que foi classificado entre as seguintes faixas: de 11 a 20 anos, de 21 a 30 anos e mais de 30 anos de infecção. Assim, dentre os pacientes com cardiopatia chagásica crônica 1 (1,0%) paciente possui de 11-20 anos de infecção, 7 (6,9%) de 21-30 anos e 94 (92,2%) pacientes mais que 30 anos. Nos pacientes indeterminados observamos que, 2 (2,3%) pacientes apresentaram de 11-20 anos, 3 (3,5%) tinham de 21-30 anos e por último 81 (94,2%) mais que 30 anos de infecção. Desta forma, casos e controles não apresentaram diferenças estatísticas entre o tempo de infecção pelo *T. cruzi*, o que não se tornará um confundidor na análise genética para a evolução da cardiopatia chagásica crônica.

A função sistólica dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica foi classificada em normal; leve; moderada e grave. Cinquenta e dois (51,0%) apresentaram função sistólica normal, 19 (18,5%) apresentaram disfunção sistólica leve, 10 (10,0%) disfunção moderada e 21 (20,5%) apresentaram disfunção sistólica grave. Todos os 86 (100%) pacientes indeterminados apresentaram função sistólica normal.

Foram incluídos 179 indivíduos sadios não infectados pelo *T. cruzi*, não relatando prévio contato com área endêmica para a doença de Chagas e residentes do Município do

Rio de Janeiro. Estes indivíduos possuíam média de idade de  $35,10 \pm 11,5$  anos, sendo 63 (35,2%) homens e 116 (64,8%) mulheres (Tabela 1).

**Tabela 1:** Dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com doença de Chagas e indivíduos saudáveis.

	Indivíduos sem		
	Cardíacos n= 102	cardiopatia aparente n= 86	Controles n=179
<b>Idade (±SD) anos</b>	57,44 (9,83)	52,81 (11,01)	35,10 (11,5)
<b>Sexo (M/F)</b>	41/61	35/51	63/116
<b>Naturalidade</b>			
<b>Bahia</b>	25 (24,5%)	25 (24,5%)	0
<b>Minas Gerais</b>	25 (24,5%)	17 (19,8%)	0
<b>Paraíba</b>	12 (11,8%)	11 (12,8%)	0
<b>Rio de Janeiro</b>	0	0	179 (100%)
<b>Tempo de infecção (anos)</b>			
<b>11-20 anos</b>	1 (1,0%)	2 (2,3%)	SN
<b>21-30 anos</b>	7 (6,9%)	3 (3,5%)	SN
<b>&gt;30 anos</b>	94 (92,2%)	81 (94,2%)	SN
<b>Função sistólica*</b>			
<b>Normal</b>	52 (51,0%)	86 (100%)	ND
<b>Leve</b>	19 (18,5%)	0	ND
<b>Moderada</b>	10 (10,0%)	0	ND
<b>Grave</b>	21 (20,5%)	0	ND

SD = desvio padrão; \*função sistólica normal >55%, leve 45% a 55%, moderada 35% a 45% e grave <35%. SN = soro negativos para *T. cruzi*; ND= não determinado.

Ao analisarmos o grupo de cardiopatia chagásica crônica de acordo com o Consenso Brasileiro em doença de Chagas de 2005, a média de idade no grupo A foi de 56,35 ( $\pm 11,03$ ) anos sendo 9 (29,0%) homens e 22 (71%) mulheres; no grupo B1 a média de idade foi de 58,03 ( $\pm 10,38$ ) anos, sendo 18 (45,0%) homens e 22 (55,0%) mulheres; no grupo B2 a média de idade foi de 60,00 ( $\pm 7,74$ ) anos, sendo 3 (50%) homens e 3 (50%) mulheres; no grupo C a média de idade foi de 57,69 ( $\pm 6,20$ ) anos e este possuía 8 (50%) homens e 8 (50%) mulheres; e por fim o grupo D com média de idade 56,44 ( $\pm 10,85$ ) anos, sendo 3 (33,3%) pacientes homens e 6 (66,7%) mulheres (Tabela 2). O tempo de infecção dos pacientes pertencentes aos grupos A, B1, B2, C e D, foi em sua maioria >30 anos 27 (87%), 37 (92,5%), 6 (50%), 15 (93,7%) e 9 (100%) respectivamente. Com base nos resultados do ecocardiograma a função sistólica dos pacientes foi avaliada, o grupo A, 31 (100%) pacientes obtiveram função sistólica normal. Já no grupo B1, 21 (52,5%) pacientes possuíram classificação normal para a função sistólica, 19 (47,5%) pacientes disfunção leve. No grupo B2, 5 (80,0%) pacientes moderada e 1 (20,0%) paciente disfunção grave. O grupo C foi composto de 5 (31,25%) pacientes possuidores de disfunção sistólica moderada e 11 (68,7%) pacientes com disfunção sistólica grave. Por fim, no grupo D, todos os 9 (100%) pacientes possuíram disfunção sistólica grave. (Tabela 2).

**Tabela 2:** Classificação clínica dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica de acordo com o Consenso Brasileiro em Chagas de 2005.

	<b>A</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
	<b>n= 31</b>	<b>n= 40</b>	<b>n=6</b>	<b>n=16</b>	<b>n=9</b>
<b>Idade (±SD) anos</b>	56,35 (11,03)	58,03 (10,38)	60,00 (7,74)	57,69 (6,20)	56,44 (10,85)
<b>Sexo (M/F)</b>	9/22	18/22	3/3	8/8	3/6
<b>Naturalidade</b>					
<b>Bahia</b>	8 (25,8%)	7 (17,5%)	2 (33,3%)	6 (37,5%)	2 (22,2%)
<b>Minas Gerais</b>	9 (29,0%)	9 (22,5%)	1 (16,7%)	2 (12,5%)	4 (44,4%)
<b>Paraíba</b>	4 (12,9%)	6 (15,0%)	1 (16,7%)	1 (6,3%)	1 (11,1%)
<b>Tempo de infecção</b>					
<b>11-20 anos</b>	0 (0,0%)	1 (2,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<b>21-30 anos</b>	4 (13,0%)	2 (5,0%)	0 (0,0%)	1 (6,3%)	0 (0,0%)
<b>&gt;30 anos</b>	27 (87,0%)	37 (92,5%)	6 (100%)	15 (93,7%)	9 (100,0%)
<b>Função sistólica*</b>					
<b>Normal</b>	31 (100,0%)	21 (52,5%)	0 (0,0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<b>Leve</b>	0 (0,0%)	19 (47,5)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<b>Moderada</b>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (80,0%)	5 (31,3%)	0 (0,0%)
<b>Grave</b>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (20,0%)	11 (68,7%)	9 (100,0%)

SD = desvio padrão; \* função sistólica normal >55%, leve 45% a 55%, moderada 35% a 45% e grave <35%.

## 5.2 ANÁLISE DO POLIMORFISMO PARA O GENE *IFNG*

### 5.2.1 Distribuição genotípica e alélica

Para a análise do polimorfismo para o gene *IFNG* na posição +874T/A, 367 amostras, contemplando os três grupos estudados, foram submetidas ao ARMS-PCR, seguindo o protocolo descrito por Pravica et. al, 2000.

A Tabela 3 mostra a comparação realizada entre os pacientes (cardíacos e sem cardiopatia aparente) com sorologia positiva para o *T. cruzi* e indivíduos controles sadios. Através da avaliação do polimorfismo de *IFNG* +874T/A nos pacientes foi possível identificar que 75 (39,9%) destes apresentaram o genótipo AA, 84 (44,7%) o genótipo AT e 29 (15,4%) apresentaram o genótipo TT. Em relação ao grupo controle, este apresentou 62 (34,6%), 91 (50,8%) e 26 (14,5%) para os genótipos AA, AT e TT respectivamente. Quando os genótipos foram comparados entre os dois grupos, não foi observada diferença estatística entre estes quando analisados por dominância ( $p= 0,5$ ) ou co-dominância ( $p= 0,29$  ou  $0,81$ ). A frequência do alelo A foi ligeiramente maior nos pacientes 234 (62,2%) do que nos controle 215 (60,1%), porém sem diferença estatística, ( $p= 0,540$ ). A frequência do alelo T foi menor nos pacientes 142 (37,8%) do que nos controles 143 (39,9%), contudo sem diferença estatística (Tabela 3).

A frequência dos genótipos e alelos dos pacientes quando estes foram divididos em pacientes com cardiopatia chagásica crônica e sem cardiopatia aparente está descrita na Tabela 4. Foi possível identificar que 26 (30,2%) pacientes sem cardiopatia aparente apresentaram genótipo AA, 42 (48,8%) AT e 18 (21,%) apresentaram genótipo TT. A análise deste polimorfismo demonstrou que entre os indivíduos classificados como cardíacos, 49 (48,0%), 42 (41,2%) e 11 (10,8%) apresentaram respectivamente genótipo AA, AT e TT. Quando os grupos de pacientes cardíacos e pacientes sem cardiopatia aparente foram

comparados foi possível observar diferença significativa entre estes quando o genótipo AA esta em dominância ( $p= 0,024$ ,  $OR = 0,32$  a  $0,53$ ) ou em co-dominância para AA (vs AT+TT;  $p=0,013$ ,  $OR= 2,13$  { $1,1 - 4,1$ }). O alelo A estava expresso em 68,6% no grupo com cardiopatia chagásica crônica e em 54,7% no grupo sem cardiopatia aparente, enquanto que o alelo T apresentou freqüência de 31,4% e 45,3% nestes grupos, com diferença estatística de  $p= 0,0053$  ( $OR = 1,82$  { $1,17 - 2,83$ }), indicando o papel protetor do alelo T para a evolução da cardiopatia chagásica crônica (Tabela 4).

Quando analisamos a freqüência genotípica e alélica entre os subgrupos de pacientes com cardiopatia chagásica crônica e pacientes sem cardiopatia aparente, observamos que foi possível identificar na análise do polimorfismo que os pacientes sem cardiopatia aparente apresentaram para genótipo AA, AT e TT respectivamente 26 (30,2%), 42 (48,8%) e 11 (20,9%). Em relação os subgrupos de pacientes com cardiopatia chagásica crônica, o subgrupo A apresentou 16 (51,6%) pacientes com genótipo AA, 14 (45,2%) com genótipo AT e 1 (3,2%) com genótipo TT. O subgrupo B1 apresentou 20 (50%) pacientes com genótipo AA, 16 (40%) pacientes com genótipo AT e 4 (10%) com genótipo TT. Já para o subgrupo B2, foi possível identificar nas análises que 2 (33,3%) pacientes eram possuidores do genótipo AA, 2 (33,3%) do genótipo AT e 2 (33,3%) do genótipo TT. As análises no subgrupo C demonstraram que 8 (50%) dos pacientes apresentaram genótipo AA, 7 (43,8%) genótipo AT e 1 (6,3%) apresentou genótipo TT. Por fim, no subgrupo D, este apresentou 3 (33,3%), 3 (33,3%) e 3 (33,3%) para os genótipos AA, AT e TT respectivamente. Quando fazemos a comparação entre genótipos do grupo A e genótipos do grupo de pacientes sem cardiopatia aparente, observamos diferença estatística de  $p=0.0075$  ( $OR= 0,9$  a  $0,54$ ), outra diferença estatística foi observada quando analisamos e comparamos genótipos dos pacientes do grupo B1+B2 e o grupo de pacientes sem cardiopatia aparente  $p=0.052$  ( $OR= 0,39$  a  $0,51$ ). Durante as outras comparações de genótipos nenhuma diferença estatística foi observada. A freqüência alélica para o alelo A foi de 94 (54,6%), 46 (74,2%), 56 (70%), 6 (50%), 23 (71,9%) e 9 (50%) respectivamente

entre os pacientes sem cardiopatia aparente e os subgrupos A, B1, B2, C e D. Quando uma comparação entre as freqüências alélicas foi realizada, diferenças estatísticas foram observadas durante a comparação entre os grupos A e o grupo de pacientes sem cardiopatia aparente  $p=0.016$  ( $OR=1,09$  a  $4,15$ ) e durante a comparação entre os grupos B1+B2 e do grupo de pacientes sem cardiopatia aparente  $p=0.044$  ( $OR=0,98$  a  $3,02$ ). Já para o alelo T a freqüência foi de 78 (45,3%), 16 (25,8%), 24 (30%), 6 (50%), 9 (28,1%) e 9 (50%) respectivamente para os pacientes sem cardiopatia aparente e os subgrupos.(Tabela 5).

**Tabela 3:** Frequência genotípica e alélica do *IFNG* +874T/A em pacientes com doença de Chagas e indivíduos controles sadios não provenientes de área endêmica para doença de Chagas.

<i>IFNG</i> +874 T/A rs2430561	Pacientes		$\chi^2$	p valor	OR
	cardíacos e pacientes sem cardiopatia aparente n= 188 (%)	Controles n= 179 (%)			
<b>Genótipos</b>					
AA	75 (39,9%)	62 (34,6%)	0,367	0,50	1,0
AT	84 (44,7%)	91 (50,8%)			0,76
TT	29 (15,4%)	26 (14,5%)			0,92
AA vs. AT + TT	75 vs 113	62 vs 117	1,08	0,29	1.25 [0,8-1,9]
TT vs. AT + AA	29 vs 159	26 vs 153	0,06	0,81	1,07 [0,6-1,9]
<b>Alelos</b>					
A	234 (62,2%)	215 (60,1%)	0,37	0,54	1,10 [0,81–1,49]
T	142 (37,8%)	143 (39,9%)			
HWE – pacientes com sorologia positiva para <i>Trypanosoma cruzi</i> $\chi^2= 0,46$ , $p= 0,49$ ; indivíduos sadios soronegativos $\chi^2= 0,63$ , $p= 0,42$					

**Tabela 4:** Frequência genotípica e alélica do *IFNG* +874T/A em pacientes com doença de Chagas na fase crônica cardíaca e pacientes soropositivos sem cardiopatia aparente.

<i>IFNG</i> +874 T/A rs2430561	Cardíacos n= 102	Sem cardiopatia aparente n= 86		$\chi^2$	p valor	OR
<b>Genótipos</b>						
AA	49 (48,0%)	26 (30,2%)		7,44	0,024	1
AT	42 (41,2%)	42 (48,8%)				0,53
TT	11 (10,8%)	18 (20,9%)				0,32
AA vs. AT + TT	49 vs 53	26 vs 60		6,17	0,013	2,13 [1,1-4,1]
TT vs. AT + AA	11 vs 91	18 vs 68		3,68	0,055	0,46 [0,19-1,1]
<b>Alelos</b>						
A	140 (68,6%)	94 (54,6%)		7,46	0,0053	1,82 [1,17-2,83]
T	64 (31,4%)	78 (45,3%)				

HWE – pacientes com cardiopatia chagásica crônica  $\chi^2= 0,19$ ,  $p=0,65$ ; pacientes sem cardiopatia aparente  $\chi^2= 0,018$ ,  $p= 0,89$

**Tabela 5:** Freqüência genotípica e alélica do *IFNG* +874T/A em pacientes com doença de Chagas na fase crônica cardíaca divididos em subgrupos e pacientes sem cardiopatia aparente.

<i>IFNG</i> +874 T/A rs2430561	A n= 31	B1 n= 40	B2 n=6	C n=16	D n=9	Sem cardiopatia aparente  n= 86
<b>Genótipos</b> <sup>1 a 6</sup>						
AA	16 (51,6%)	20 (50%)	2 (33,3%)	8 (50,0%)	3 (33,3%)	26 (30,2%)
AT	14 (45,2%)	16 (40%)	2 (33,3%)	7 (43,8%)	3 (33,3%)	42 (48,8%)
TT	1 (3,2%)	4 (10%)	2 (33,3%)	1 (6,3%)	3 (33,3%)	18 (20,9%)
<b>AA vs. AT + TT</b> <sup>7 a 12</sup>						
<b>TT vs. AT + A</b> <sup>13 a 18</sup>						
<b>Alelos</b>						
A <sup>19 a 24</sup>	46 (74,2%)	56 (70%)	6 (50%)	23 (71,9%)	9 (50%)	94 (54,6%)
T	16 (25,8%)	24 (30%)	6 (50%)	9 (28,1%)	9 (50%)	78 (45,3%)

<sup>1</sup> $p=0.0075$  ( $\chi^2=7,15$ ) OR: 0,09-0,54 entre grupos A e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>2</sup> $p=0.052$  ( $\chi^2=3,77$ ) entre grupos B1+B2 e pacientes sem cardiopatia aparente;

<sup>3</sup> $p=0,25$  ( $\chi^2=1,31$ ) entre C+D e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>4</sup> $p=0,37$  ( $\chi^2= 0,80$ ) entre B1+B2 e vs A; <sup>5</sup> $p=0,24$  ( $\chi^2= 1,35$ )entre C+D vs A; <sup>6</sup> $p=0,70$  ( $\chi^2=0,14$ ) entre C+D vs B1+B2.

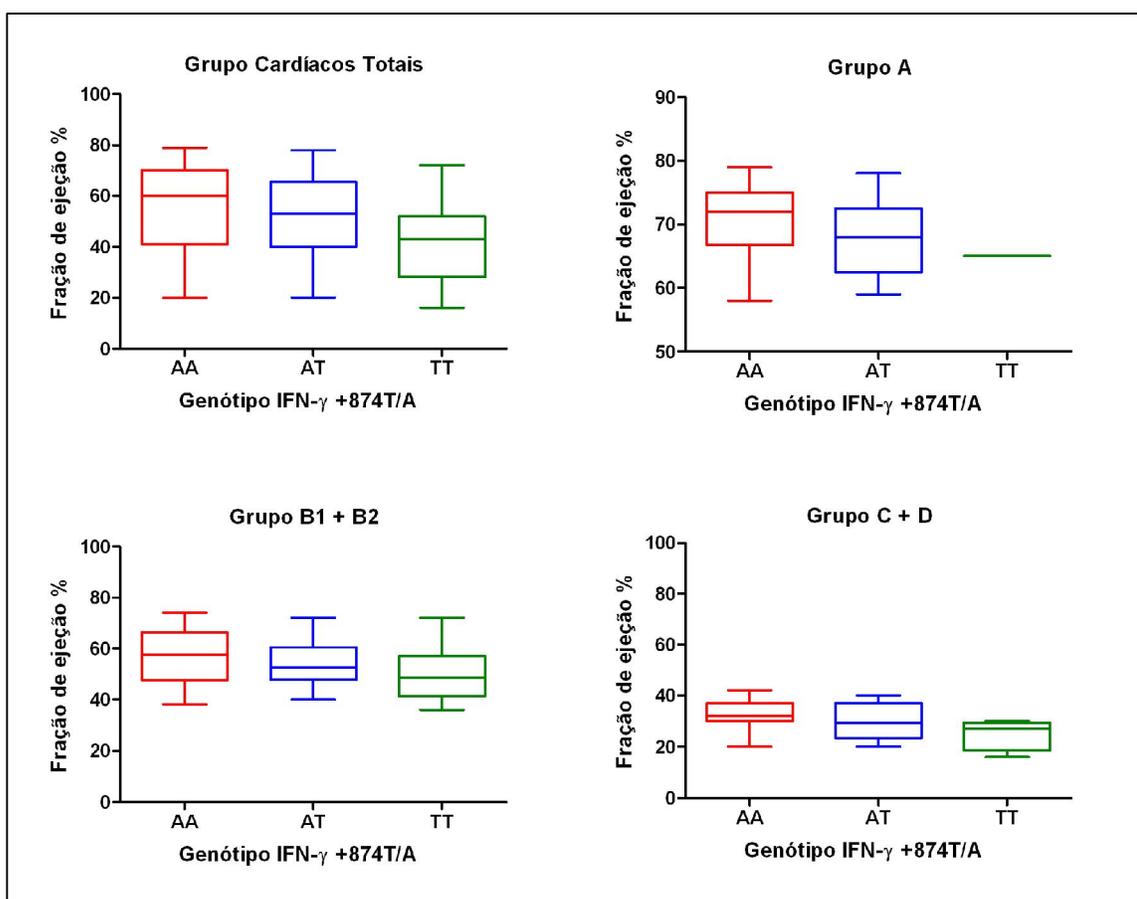
<sup>7</sup> **p=0.033** ( $\chi^2=4,53$ ) OR: 0,98-6,22 entre os grupos A e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>8</sup> **p=0.045** ( $\chi^2=4,01$ ) OR: 0,95-4,74 entre os grupos B1+B2 e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>9</sup> **p=0.19** ( $\chi^2=1,65$ ) entre C+D e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>10</sup> **p=0.75** ( $\chi^2=0,11$ ) entre B1+B2 e vs A; <sup>11</sup> **p=0.57** ( $\chi^2=0,32$ ) entre entre C+D vs A; <sup>12</sup> **p=0.75** ( $\chi^2=0,10$ ) entre C+D vs B1+B2.

<sup>13</sup> **p\*=0.021** ( $\chi^2=5,25$ ) OR: 0,01-0,97 entre grupos A e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>14</sup> **p=0.26** ( $\chi^2=1,25$ ) entre grupos B1+B2 e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>15</sup> **p\*\*=0.41** ( $\chi^2=0,30$ ) entre C+D e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>16</sup> **p\*\*=0.14** ( $\chi^2= 2,16$ ) entre B1+B2 e vs A; <sup>17</sup> **p\*\*=0.11** ( $\chi^2=2,78$ ) entre entre C+D vs A; <sup>18</sup> **p\*\*=0.49** ( $\chi^2=0,12$ ) entre C+D vs B1+B2.

<sup>19</sup> **p=0.016** ( $\chi^2=5,73$ ) entre grupos A e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>20</sup> **p=0.044** ( $\chi^2=4,02$ ) entre grupos B1+B2 e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>21</sup> **p=0.24** ( $\chi^2=1,38$ ) entre C+D e pacientes sem cardiopatia aparente; <sup>22</sup> **p=0.36** ( $\chi^2=0,82$ ) entre B1+B2 vs A; <sup>23</sup> **p=0.24** ( $\chi^2=1,36$ ) entre entre C+D vs A; <sup>24</sup> **p=0.68** ( $\chi^2=0,17$ ) entre C+D vs B1+B2.”

Averiguamos se haveria associação entre os valores percentuais da fração de ejeção e os genótipos para o polimorfismo de IFN- $\gamma$  +874T/A, em indivíduos com cardiopatia chagásica crônica. As análises foram realizadas inicialmente em todos os cardiopatas (figura 8 A) que mostrou uma tendência (Anova  $p=0,0597$ ) para percentuais menores na fração de ejeção em indivíduos portadores do genótipo TT (mediana 43, mínimo 16 e máximo 72,  $n=11$ ); comparados com os portadores do genótipo AA (mediana 60, mínimo 20 e máximo 70,  $n=49$ ) ou aqueles portadores do genótipo AT (mediana 53, mínimo 20, máximo 78,  $n=41$ ). Não observamos diferenças significativas em relação aos grupos de Classificação A, B1+B2 e C+D (figura 8 B,C e D).

**Figura 9:** Os gráficos acima representam a distribuição dos valores de fração de ejeção nos



diferentes genótipos para o polimorfismo de IFN- $\gamma$  +874T/A (AA, AT e TT). A análise foi realizada no grupo cardíaco total, no grupo de paciente A, B1+B2 e C+D.

## 6 DISCUSSÃO

O papel do IFN- $\gamma$  é ainda contraditório no desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica, sendo, por alguns autores considerado como deletério por alguns autores (revisado por Cunha-Neto et al., 2009; D'Ávila et al., 2009; revisado por Gutierrez et al. 2009; revisado por Cunha-Neto et al., 2011; revisado por Marin-Neto et al., 2011) , mediando a ativação de células T CD8 citotóxicas e lesão tecidual e benéfico para outros autores (Gomes et al., 2003; Laucella et al., 2004; Cunha-Neto et al., 2005; Albareda et al., 2006). Contudo, na forma indeterminada, IL-10 bloquearia a expressão de INF- $\gamma$ , suprimindo a resposta lesiva às células miocárdicas. O desequilíbrio destas citocinas por si só ainda não pode ser explicado, visto que somente um terço dos pacientes com a infecção por *T. cruzi*, desenvolvem a cardiopatia chagásica crônica. Assim, nosso objetivo foi identificar na população brasileira a diversidade de expressão genotípica do SNP +874T/A do *IFNG*. Este SNP confere uma secreção diferenciada para os portadores dos alelos AA, AT e TT, como sendo baixos, médios e altos produtores de INF- $\gamma$  (Pravica et al., 2000).

Até o momento (março de 2011) somente sete trabalhos descrevem o polimorfismo do SNP +874T/A do *IFNG* na população brasileira, em relação a várias patogenias: (Hepatite C) (Pereira et al., 2008); Leishmaniose (Matos et al., 2007); Pancreatite Crônica (Bendicho et al., 2005); Paracocidioidomiose (Bozzi et a., 2009); Toxoplasmose (Albuquerque et al., 2009); Tuberculose (Amim et al., 2008 e Vallinoto et al., 2010) mas não há referencias a este polimorfismo na doença de Chagas em nossa população. A freqüência do genótipo TT dito como protetor varia de 9,0 a 25% e nossos resultados mostram freqüência mediana de 14,5% nos indivíduos

saudáveis. Não observamos diferença estatística entre os pacientes com doença de Chagas (n=188) provenientes de vários estados do Brasil e indivíduos sadios (n=179) provenientes do Rio de Janeiro, em relação as frequências genotípicas e alélicas. Contudo, Torres et al. (2010) descreveram recentemente na população Colombiana uma associação entre a susceptibilidade a doença e o genótipo AA (baixo produtor de IFN- $\gamma$ ), quando pacientes chagásicos foram comparados a indivíduos controles da mesma área geográfica da província de Santander na Colômbia. Como a população de pacientes com a doença de Chagas por nós estudada, era proveniente de dezesseis Estados do Brasil, sendo 25%, 42% e 23% representantes da Bahia, Minas Gerais e Paraíba, respectivamente e a população controle sadia estudada era proveniente do Estado do Rio de Janeiro, pode haver alguma interferência na expressão deste SNP em diferentes áreas geográficas do Brasil. As frequências do SNP +874T/A do *IFNG* na população brasileira foram descritas em residentes dos Estados do Para (24% para o genótipo TT), Rio de Janeiro (9, e 18%), Bahia (9,5 e 9,6 %), Goiás (25%) e Minas Gerais (19%), mostrando uma possível associação com a colonização destas áreas no Brasil, pois a distribuição deste SNP é ampla. A população de pacientes chagásicos analisada por nosso grupo é proveniente do Hospital de Doenças Infecciosas - IPEC no Estado do Rio de Janeiro, onde a maioria dos pacientes agora reside. Em media estes indivíduos saíram da área endêmica de Chagas há cerca de 30 anos.

Quando analisamos a frequência genotípica e alélica entre indivíduos com cardiopatia chagásica crônica (n=102) e indeterminados (n=86) observamos uma diferença estatística ( $p= 0,024$ ) no modelo de co-dominância, sugerindo que o genótipo TT possuía papel protetor, sendo mais encontrado nos pacientes indeterminados, assintomáticos, do que em pacientes com cardiopatia chagásica crônica. No modelo de dominância genética, pacientes portadores do genótipo AA tem

2,13 ( $p=0,013$ ) vezes chances de desenvolverem a cardiopatia chagásica crônica se comparados aos portadores do genótipo AT ou TT. Enquanto que aqueles portadores do genótipo TT no modelo recessivo tem 0,46 ( $p=0,055$ ) vezes de chance para desenvolverem a cardiopatia chagásica crônica. Contudo, a única publicação disponível no momento (Torres et. al., 2010), os autores não encontram associação com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica entre os pacientes cardiopatas e indeterminados na população Colombiana. Não há descrição dos diferentes estágios clínicos da doença de Chagas. Nossa casuística está sendo acompanhada clinicamente há cerca de 20 anos, o que nos possibilitou estratificar os cardiopatas de acordo com a gravidade da doença. Assim, evidenciamos que o início das manifestações cardíacas pode estar fortemente associada ao polimorfismo de *IFNG*, pois pacientes com cardiopatia chagásica crônica do grupo A, portadores do genótipo AA são mais susceptíveis ao adocimento que aqueles assintomáticos portadores do mesmo genótipo ( $p=0,0075$ ; OR = 0.09). Não evidenciamos diferenças entre os assintomáticos e os pacientes com cardiopatia chagásica crônica dos grupos B1/B2 ou C/D.

Assim, nossos resultados apontam para uma associação entre o SNP +874T/A e o início da cardiopatia chagásica crônica, não sendo associado com o agravamento das manifestações clínicas cardíacas. Se levarmos em consideração que níveis séricos de  $IFN-\gamma$  podem estar associados com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica, como hipotetizados por Gomes et al., 2003, , nossos resultados vão contra estas hipóteses, visto que pacientes portadores do genótipo TT, altos produtores de  $IFN-\gamma$ , estão menos susceptíveis a desenvolverem a cardiopatia chagásica crônica. Ainda há questões a serem respondidas em relação ao sítio das lesões cardíacas, visto que há aumento desta citocina no miocárdio, sendo produzidas por células T CD4. Da mesma forma,  $IFN-\gamma$  esta sendo proposto como marcador de

cura para pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol indicando uma diminuição da carga parasitaria (Laucella et al.,2009).

## 7 CONCLUSÕES

- 1- Não evidenciamos associação dos genótipos de IFN- $\gamma$ , na posição +874T/A entre pacientes e indivíduos sadios, indicando não existir influencia deste polimorfismo com a infecção pelo *T. cruzi*.
- 2- O genótipo AA no gene que codifica IFN- $\gamma$ , na posição +874T/A foi associado à maior suscetibilidade para a transição de indivíduos sem cardiopatia aparente para a forma crônica cardíaca da doença de Chagas. Pacientes portadores do alelo A, ditos como baixos produtores de IFN- $\gamma$  têm 1,8 vezes de chances de desenvolverem a cardiopatia chagásica crônica.
- 3- O genótipo AA no gene que codifica IFN- $\gamma$ , na posição +874T/A não foi associado à progressão da cardiopatia, determinada pelas alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas.

## PERSPECTIVAS

- 1- Como a doença de Chagas é uma infecção que inclui várias formas clínicas, várias fases evolutivas do parasito, distribuição geográfica de cepas do *T. cruzi*, além de uma complexa resposta imunológica do hospedeiro, que possivelmente levaria a uma variação gênica do hospedeiro também relevante. A identificação de outros SNPs relacionados a resposta imune poderá aumentar nosso conhecimento sobre a patogenia da doença de Chagas.
- 2- Mutações não silenciosas podem induzir modificações na produção de citocinas, quimiocinas e alterar a resposta do hospedeiro ao *T. cruzi*. Assim, comparar os diferentes genótipos do gene de IFN- $\gamma$  e outras citocinas aos níveis séricos de seus produtos poderá nos auxiliar para determinarmos o real papel destes marcadores na cardiopatia chagásica crônica.

**REFERÊNCIAS**

[Abel LC](#), [Rizzo LV](#), [Ianni B](#), [Albuquerque F](#), [Bacal F](#), [Carrara D](#), [Bocchi EA](#), [Teixeira HC](#), [Mady C](#), [Kalil J](#), [Cunha-Neto E](#). Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to Trypanosoma cruzi infection. [J Autoimmun](#). 2001 Aug;17(1):99-107.

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001 Aug;2(8):675-80.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):499-511.

Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, Postan M. Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol*. 2006 Mar;18(3):465-71. Epub 2006 Jan 23.

Albuquerque MC, Aleixo AL, Benchimol EI, Leandro AC, das Neves LB, Vicente RT, Bonecini-Almeida Mda G, Amendoeira MR. The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 May;104(3):451-5.

Amim LH, Pacheco AG, Fonseca-Costa J, Loredó CS, Rabahi MF, Melo MH, Ribeiro FC, Mello FC, Oliveira MM, Lapa e Silva JR, Ottenhoff TH, Kritski AL, Santos AR. Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects. *Mol Biol Rep*. 2008 Dec;35(4):563-6. Epub 2007 Aug 8.

[Andrade LO](#), [Andrews NW](#). The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. [Nat Rev Microbiol](#). 2005 Oct;3(10):819-23.

Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Trypanosoma cruzi: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol*. 2002 Apr;100(4):269-75.

Andrade Z. Immunopathology of Chagas disease, *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl I) (1999), pp. 71-80. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (59) *Acta Trop*. 2010 Jul-Aug;115(1-2):5-13. Epub 2010 Apr 9.

Araujo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, Morato MJ, Correa-Oliveira R. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci*. 2007 May 1;12:2797-806.

[Bahia-Oliveira LM](#), [Gomes JA](#), [Rocha MO](#), [Moreira MC](#), [Lemos EM](#), [Luz ZM](#), [Pereira ME](#), [Coffman RL](#), [Dias JC](#), [Cançado JR](#), [Gazzinelli G](#), [Corrêa-Oliveira R](#). IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? [Braz J Med Biol Res](#). 1998 Jan;31(1):127-31.

Barretto MP. Reservatórios de Trypanosoma cruzi nas Américas. Rev Bras Malariol Doenças Trop 16: 527-552. 1964

Bendicho MT, Guedes JC, Silva NN, Santana GO, dos Santos RR, Lyra AC, Lyra LG, Meyer R, Lemaire DC. Polymorphism of cytokine genes (TGF-beta1, IFN-gamma, IL-6, IL-10, and TNF-alpha) in patients with chronic pancreatitis. Pancreas. 2005 May;30(4):333-6.

Bestetti RB, Cardinalli-Neto A. Sudden cardiac death in Chagas' heart disease in the contemporary era. Int J Cardiol. 2008 Dec 17;131(1):9-17. Epub 2008 Aug 9. Review.

[Bidwell J](#), [Keen L](#), [Gallagher G](#), [Kimberly R](#), [Huizinga T](#), [McDermott MF](#), [Oksenberg J](#), [McNicholl J](#), [Pociot F](#), [Hardt C](#), [D'Alfonso S](#). Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. [Genes Immun](#). 2001 Apr;2(2):61-70.

Bonecini-Almeida Mda G, Galvão-Castro B, Pessoa MH, Pirmez C, Laranja F. [Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. I. Clinical, parasitological, hematological and anatomic-pathological studies in the acute and indeterminate phase of the disease](#). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990 Apr-Jun;85(2):163-71.

Bozzi A, Reis BS, Pereira PP, Pedroso EP, Goes AM. Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis. Cytokine. 2009 Dec;48(3):212-7. Epub 2009 Aug 13.

Brière F, Servet-Delprat C, Bridon JM, Saint-Remy JM, Banchereau J. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. J Exp Med. 1994 Feb 1;179(2):757-62.

[Brum-Soares LM](#), [Xavier SS](#), [Sousa AS](#), [Borges-Pereira J](#), [Ferreira JM](#), [Costa IR](#), [Junqueira AC](#), [Coura JR](#). Morbidity of Chagas disease among autochthonous patients from the Rio Negro microregion, State of Amazonas. [Rev Soc Bras Med Trop](#). 2010 Apr;43(2):170-7.

Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol. 2001;167(1):416-23.

Carod-Artal FJ. Stroke: a neglected complication of American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Nov;101(11):1075-80. Epub 2007 Jul 30. Review.

[Cerban FM](#), [Gea S](#), [Menso E](#), [Vottero-Cima E](#). Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993 Apr;67(1):25-30. Chagas, C. Nova trypanozomiasse humana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 11-80 (1909).

[Cheong JY](#), [Cho SW](#), [Chung SG](#), [Lee JA](#), [Yeo M](#), [Wang HJ](#), [Lee JE](#), [Hahm KB](#), [Kim JH](#). Genetic polymorphism of interferon-gamma, interferon-gamma receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis B virus infection. *Biochem Genet.* 2006 Jun;44(5-6):246-55. Epub 2006 Aug 30.

Chong, W.P., Ip, W.K., Tso, G.H., Ng, M.W., Wong, W.H., Law, H.K., Yung, R.W., Chow, E.Y., Au, K.L., Chan, E.Y., Lim, W., Peiris, J.S., Lau, Y.L. The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. *BMC Infect. Dis.* 6, 82. 2006.

[Cordeiro FD](#), [Martins-Filho OA](#), [Da Costa Rocha MO](#), [Adad SJ](#), [Corrêa-Oliveira R](#), [Romanha AJ](#). Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 Jan;8(1):112-8.

[Cordova E](#), [Boschi A](#), [Ambrosioni J](#), [Cudos C](#), [Corti M](#). Reactivation of Chagas disease with central nervous system involvement in HIV-infected patients in Argentina, 1992-2007. *Int J Infect Dis.* 2008 Nov;12(6):587-92. Epub 2008 Mar 11.

Córdova E, Maiolo E, Corti M, Orduña T. Neurological manifestations of Chagas' disease. *Neurol Res.* 2010 Apr;32(3):238-44.

[Corrêa-Oliveira R](#), [Gomes J](#), [Lemos EM](#), [Cardoso GM](#), [Reis DD](#), [Adad S](#), [Crema E](#), [Martins-Filho OA](#), [Costa MO](#), [Gazzinelli G](#), [Bahia-Oliveira LM](#). The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:253-5.

Coura JR 2007. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 113-122.

Coura JR 2008. Doença de Chagas. In: JR Coura (ed), Síntese das doenças infecciosas e parasitárias, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 12-18.

Coura JR, de Abreu LL, Pereira JB, Willcox HP. Morbidity in Chagas' disease. IV. Longitudinal study of 10 years in Pains and Iguatama, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985 Jan-Mar;80(1):73-80.

Coura JR, de Abreu LL, Pereira JB, Willcox HP. Morbidity in Chagas' disease. IV. Longitudinal study of 10 years in Pains and Iguatama, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985 Jan-Mar;80(1):73-80.

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.

Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 Trypanosoma cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest. 1996 Oct 15;98(8):1709-12.

Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F, Abel L, Guilherme L, Bocchi E, Bacal F, Carrara D, Ianni B, Mady C, Kalil J. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. Braz J Med Biol Res. 1998 Jan;31(1):133-7

Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalil J, Liew CC. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. Am J Pathol. 2005 Aug;167(2):305-13.

Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104 Suppl 1:252-8.

Cunha-Neto E, Teixeira PC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. Autoimmun Rev. 2011 Jan;10(3):163-5. Epub 2010 Sep 29.

[D'Avila DA](#), [Guedes PM](#), [Castro AM](#), [Gontijo ED](#), [Chiari E](#), [Galvão LM](#). Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. [Mem Inst Oswaldo Cruz](#). 2009 Feb;104(1):100-5.

[de Barros-Mazon S](#), [Guariento ME](#), [da Silva CA](#), [Coffman RL](#), [Abrahamsohn IA](#). Differential regulation of lymphoproliferative responses to Trypanosoma cruzi

antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. [Clin Immunol](#). 2004 Apr;111(1):137-45.

de Rezende JM, Rosa H, Vaz Mda G, Andrade-Sá N, Porto JD, Neves Neto J, Ximenes JA. Endoscopy in megaesophagus. Prospective study of 600 cases. *Arq Gastroenterol*. 1985 Apr-Jun;22(2):53-62.

Deane LM. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 16: 27-48. 1964

[Derynck R](#), [Leung DW](#), [Gray PW](#), [Goeddel DV](#). Human interferon gamma is encoded by a single class of mRNA. [Nucleic Acids Res](#). 1982 Jun 25;10(12):3605-15.

Dias JC, Kloetzel K. The prognostic value of the electrocardiographic features of chronic Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1968 May-Jun;10(3):158-62

Dias JC. [Epidemiological surveillance of Chagas disease](#). *Cad Saude Publica*. 2000;16 Suppl 2:43-59. Portuguese.

Dias JCP, Coura JR. Epidemiologia. In JCP Dias, JR Coura (eds), *Clínica e terapêutica da doença de Chagas*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 33-66. 1997

Dias JCP, Macedo VO. Doença de Chagas. In JR Coura (ed), *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 557-593. 2005

Dias JCP. História natural. In: Cançado JR, Chuster M. *Cardiopatia Chagásica*. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, 1985: 99- 113

d'Imperio Lima MR, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol*. 1986 Jul 1;137(1):353-6.

Dourado PM, Tsutsui JM, Mathias W Jr, Andrade JL, da Luz PL, Chagas AC. [Evaluation of stunned and infarcted canine myocardium by real time myocardial contrast echocardiography](#). *Braz J Med Biol Res*. 2003 Nov;36(11):1501-9. Epub 2003 Oct 22.

[Dutra WO](#), [Martins-Filho OA](#), [Cançado JR](#), [Pinto-Dias JC](#), [Brener Z](#), [Freeman Júnior GL](#), [Colley DG](#), [Gazzinelli G](#), [Parra JC](#). Activated T and B lymphocytes in

peripheral blood of patients with Chagas' disease. [Int Immunol](#). 1994 Apr;6(4):499-506.

[Fanger MW](#), [Guyre PM](#). Bispecific antibodies for targeted cellular cytotoxicity. [Trends Biotechnol](#). 1991 Nov;9(11):375-80.

Fiuza JA, Fujiwara RT, Gomes JA, Rocha MO, Chaves AT, de Araújo FF, Fares RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho Ode A, Caçado GG, Correa-Oliveira R. Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Sep 9;3(9):e512.

[Gangwar R](#), [Pandey S](#), [Mittal RD](#). Association of interferon-gamma +874A polymorphism with the risk of developing cervical cancer in north-Indian population. [BJOG](#). 2009 Nov;116(12):1671-7. Epub 2009 Aug 14.

Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(12):895-906.

Genetic Variation in Individuals: Mutation and Polymorphism, in *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* (6th ed), edited by Nussbaum R, McInnes R, Willard H, Sixth ed, Philadelphia, WB Saunders Company, 2001, pp 79–94

[Giordanengo L](#), [Maldonado C](#), [Rivarola HW](#), [Iosa D](#), [Girones N](#), [Fresno M](#), [Gea S](#). Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring. [Eur J Immunol](#). 2000 Nov;30(11):3181-9.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS, Correa-Oliveira R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):7960-6.

[Gomes JA](#), [Bahia-Oliveira LM](#), [Rocha MO](#), [Martins-Filho OA](#), [Gazzinelli G](#), [Correa-Oliveira R](#). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. [Infect Immun](#). 2003 Mar;71(3):1185-93.

[Graefe SE](#), [Jacobs T](#), [Gaworski I](#), [Klaunberg U](#), [Steege C](#), [Fleischer B](#). Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. [Microbes Infect](#). 2003 Aug;5(10):833-9.

[Gray PW](#), [Goeddel DV](#). Structure of the human immune interferon gene. [Nature](#). 1982 Aug 26;298(5877):859-63.

[Gray PW](#), [Leung DW](#), [Pennica D](#), [Yelverton E](#), [Najarian R](#), [Simonsen CC](#), [Derynck R](#), [Sherwood PJ](#), [Wallace DM](#), [Berger SL](#), [Levinson AD](#), [Goeddel DV](#). Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. [Nature](#). 1982 Feb 11;295(5849):503-8.

[Guedes PM](#), [Veloso VM](#), [Gollob KJ](#), [Afonso LC](#), [Caldas IS](#), [Vianna P](#), [de Lana M](#), [Chiari E](#), [Bahia MT](#), [Galvão LM](#). IgG isotype profile is correlated with cardiomegaly in Beagle dogs infected with distinct *Trypanosoma cruzi* strains. [Vet Immunol Immunopathol](#). 2008 Jul 15;124(1-2):163-8. Epub 2008 Mar 21.

Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol*. 2009 Nov;31(11):673-85.

[Haukim N](#), [Bidwell JL](#), [Smith AJ](#), [Keen LJ](#), [Gallagher G](#), [Kimberly R](#), [Huizinga T](#), [McDermott MF](#), [Oksenberg J](#), [McNicholl J](#), [Pociot F](#), [Hardt C](#), [D'Alfonso S](#). Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. [Genes Immun](#). 2002 Sep;3(6):313-30.

[Higuchi M 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 M.L. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasites antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (Suppl I) (1999), pp. 263–267.

Hoare CA. The classification of mammalian trypanosomes. *Ergeb Mikrobiol Immunitätsforsch Exp Ther*. 1966;39:43-57.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1313-8.

[Hölscher C](#), [Köhler G](#), [Müller U](#), [Mossmann H](#), [Schaub GA](#), [Brombacher F](#). Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. [Infect Immun](#). 1998 Mar;66(3):1208-15.

Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. A *Trypanosoma cruzi* DNA sequence amplified from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Trans Assoc Am Physicians*. 1992;105:182-9.

Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010 Sep 15;12:e29. Review.

Kamali-Sarvestani E, Rasouli M, Mortazavi H, Gharesi-Fard B. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Iranian patients. *Cytokine*. 2006 Aug;35(3-4):159-65. Epub 2006 Sep 6.

[Kawano Y](#), [Noma T](#), [Yata J](#). Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J Immunol*. 1994 Dec 1;153(11):4948-58.

[Kayama H](#), [Takeda K](#). The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect*. 2010 Jul;12(7):511-7. Epub 2010 Mar 27.

[Kierszenbaum F](#). Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Apr;12(2):210-23.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007 Mar 6;115(9):1109-23.

Matos GI, Covas Cde J, Bittar Rde C, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, Amato VS, Oliveira-Neto MP, Mattos Mda S, Pirmez C, Sampaio EP, Moraes MO, Da-Cruz AM. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis*. 2007 Apr 24;7:33.

Meneghelli UG. Chagas' disease: a model of denervation in the study of digestive tract motility. *Braz J Med Biol Res*. 1985;18(3):255-64.

Meneghelli UG. Chagasic enteropathy. *Revista de Medicina Tropical*, v. 307, p. 252-260, 2004.

[Michailowsky V](#), [Luhrs K](#), [Rocha MO](#), [Fouts D](#), [Gazzinelli RT](#), [Manning JE](#). Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infect Immun*. 2003 Jun;71(6):3165-71.

Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol*. 1986 Dec;24(6):661-8.

Möller M, Nebel A, van Helden PD, Schreiber S, Hoal EG. Analysis of eight genes modulating interferon gamma and human genetic susceptibility to tuberculosis: a case-control association study. *BMC Infect Dis*. 2010 Jun 7;10:154.

[Moran A](#), [Ma X](#), [Reich RA](#), [Graviss EA](#). No association between the +874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN-gamma gene and susceptibility to TB. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007 Jan;11(1):113-5.

[Morgan J](#), [Dias JC](#), [Gontijo ED](#), [Bahia-Oliveira L](#), [Correa-Oliveira R](#), [Colley DG](#), [Powell MR](#). Anti-Trypanosoma cruzi antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. [Am J Trop Med Hyg](#). 1996 Oct;55(4):355-9.

[Namian AM](#), [Shahbaz S](#), [Salmanpoor R](#), [Namazi MR](#), [Dehghani F](#), [Kamali-Sarvestani E](#). Association of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha polymorphisms with susceptibility to vitiligo in Iranian patients. [Arch Dermatol Res](#). 2009 Jan;301(1):21-5. Epub 2009 Sep 27.

[Naylor SL](#), [Sakaguchi AY](#), [Shows TB](#), [Law ML](#), [Goeddel DV](#), [Gray PW](#). Human immune interferon gene is located on chromosome 12. [J Exp Med](#). 1983 Mar 1;157(3):1020-7.

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989 Apr 11;17(7):2503-16.

Nijjar SS, del Bigio MR. Cerebral trypanosomiasis in an incarcerated man. *CMAJ* 2007; 176: 448

Nogueira N. and Coura J.R. American Trypanosomiasis (Chagas' disease). In: K.S. Warren and A.A.F. Mahmoud, Editors, *Tropical and Geographical Medicine* (2nd ed.), McGraw-Hill, New York (1990), pp. 281–296.

[Owerbach D](#), [Rutter WJ](#), [Shows TB](#), [Gray P](#), [Goeddel DV](#), [Lawn RM](#). Leukocyte and fibroblast interferon genes are located on human chromosome 9. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 1981 May;78(5):3123-7.

Pacheco, A.G., Cardoso, C.C., Moraes, M.O. *IFNG* +874T/A, *IL10*-1082G/A and *TNF* \_308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum. Genet*. 123, 477–484. 2008

Parra OM, Saad WA, Tambascia JK, Lopes ZA. Histological aspects of the cardia and their relation to cardiomyotomies of megaesophagus. *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1976 Dec;22(12):447-8. Portuguese.

Pereira FA, Pinheiro da Silva NN, Rodart IF, Carmo TM, Lemaire DC, Reis MG. Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection *J Med Virol*. 2008 Jan;80(1):58-64.

Pereira JB, da Cunha RV, Willcox HP, Coura JR. Development of chronic human chagas cardiopathy in the hinterland of the Paraíba State, Brazil, in a 4.5 year period. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1990 Jul-Sep;23(3):141-7.

Pompilio MA, Dorval ME, Cunha RV, Britto C, Borges-Pereira J. Epidemiological, clinical and parasitological aspects of Chagas' disease in Mato Grosso do Sul State. [Rev Soc Bras Med Trop](#). 2005 Nov-Dec;38(6):473-8. Epub 2006 Jan 4.

Portal do Ministério da saúde, 2009. Disponível em:  
[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1530](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530)

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. *Lancet Infect Dis* 2001; 2: 92–100

Pravica, V., Perrey, C., Stevens, A., Lee, J.H., Hutchinson, I.V. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum. Immunol.* 61, 863–866. 2000

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

Rassi-Junior A., Rassi A. and Rassi S.G. Predictions of mortality in chronic Chagas disease: a systemic review of observational studies, *Circulation* 115 (2005), pp. 1101–1108.

Reis DD, Gazzinelli RT, Gazzinelli G, Colley DG. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas disease. *J Immunol.* 150, 1611-8, 1993.

[Reis MM](#), [Higuchi Mde L](#), [Benvenuti LA](#), [Aiello VD](#), [Gutierrez PS](#), [Bellotti G](#), [Pileggi F](#). An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. [Clin Immunol Immunopathol](#). 1997 May;83(2):165-72.

[Ribeirão M](#), [Pereira-Chioccola VL](#), [Rénia L](#), [Augusto Fragata Filho A](#), [Schenkman S](#), [Rodrigues MM](#). Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. [Parasite Immunol](#). 2000 Jan;22(1):49-53.

Ribeiro CS, Visentainer JE, Moliterno RA. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Jun;102(4):435-40. nota

Siciliano, APRV; Hasslocher-Moreno, A; Souza, AS; Brasil, PEAA; Holanda, MT; Garcia, MY; Xavier, SS. Padrão da função diastólica e relação com a gravidade da forma clínica em 902 pacientes na fase crônica da doença de Chagas / Pattern of diastolic function and is relation to the severity of the clinical

form in 902 patients in the chronic phase of Chagas disease . SOCERJ;19(1):74-83, jan.-fev. 2006.

[Shows TB](#), [Sakaguchi AY](#), [Naylor SL](#), [Goedell DV](#), [Lawn RM](#). Clustering of leukocyte and fibroblast interferon genes of human chromosome 9. [Science](#). 1982 Oct 22;218(4570):373-4.

Silva, J.S., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Mohler, K.M., Anderson, D., Reed, S.G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection. J. Exp. Med. 175, 169–174. 1992.

Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5283-91.

[Tangwattanachuleeporn M](#), [Sodsai P](#), [Avihingsanon Y](#), [Wongpiyabovorn J](#), [Wongchinsri J](#), [Hirankarn N](#). Association of interferon-gamma gene polymorphism (+874A) with arthritis manifestation in SLE. [Clin Rheumatol](#). 2007 Nov;26(11):1921-4. Epub 2007 Aug 23.

Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 15;94(8):3932-7.

Tarleton RL. Immune system recognition of Trypanosoma cruzi. Curr Opin Immunol. 2007 Aug;19(4):430-4. Epub 2007 Jul 24. Review.

Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González A, González CI, Martín J. Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. Infect Genet Evol. 2010 Jul;10(5):682-5. Epub 2010 Mar 30.

Torrico, F., Heremans, H., Rivera, M.T., Van Marck, E., Billiau, A., Carlier, Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice. J. Immunol. 146, 3626–3632. 1991.

Trent JM, Olson S, Lawn RM. Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Dec;79(24):7809-13.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S Jr, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. Genetic characterization of Trypanosoma cruzi

directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol.* 2000 May;156(5):1805-9.

Vallinoto AC, Graça ES, Araújo MS, Azevedo VN, Cayres-Vallinoto I, Machado LF, Ishak MO, Ishak R. IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis. *Hum Immunol.* 2010 Jul;71(7):692-6. Epub 2010 Apr 27.

van Deventer SJ. Cytokine and cytokine receptor polymorphisms in infectious disease. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S98-102.

Verçosa AF, Lorena VM, Carvalho CL, Melo MF, Cavalcanti MG, Silva ED, Ferreira AG, Pereira VR, Souza WV, Gomes YM. [Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic \(CRA\) and flagellar \(FRA\) recombinant repetitive antigens of Trypanosoma cruzi in chronic Chagasic patients.](#) *J Clin Lab Anal.* 2007;21(5):271-6.

[Vespa GN](#), [Cunha FQ](#), [Silva JS](#). Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun.* 1994 Nov;62(11):5177-82.

Viotti RJ, Vigliano C, Laucella S, Lococo B, Petti M, Bertocchi G, Ruiz Vera B, Armenti H. Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. *Heart.* 2004 Jun;90(6):655-60.

[Vitelli-Avelar DM](#), [Sathler-Avelar R](#), [Dias JC](#), [Pascoal VP](#), [Teixeira-Carvalho A](#), [Lage PS](#), [Elói-Santos SM](#), [Corrêa-Oliveira R](#), [Martins-Filho OA](#). Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 2005 Sep;62(3):297-308.

Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, Faria AM, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol.* 2008 Nov;68(5):516-25. Epub 2008 Sep 18.

Xavier, S.S. Estudo longitudinal da morbi-mortalidade cardíaca da doença de Chagas em uma coorte de um grande centro urbano: análise clínica, eletrocardiográfica, radiológica e ecocardiográfica de 604 casos. Rio de Janeiro, 1999. 181 p. Tese (Doutorado em Medicina). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Xavier, S.S. et al. Aplicação da nova classificação da insuficiência cardíaca (ACC/AHA) na cardiopatia chagásica crônica: Análise crítica das curvas de sobrevida. Revista da SOCERJ, Rio de Janeiro, v. maio/jun, p. 227-232, 2005.

Zauza PL, Borges-Pereira J. Sera levels of anti-Trypanosoma cruzi IgG in the course of chronic chagasic cardiopathy in 10 years. Rev Soc Bras Med Trop. 2001 Sep-Oct;34(5):399-405.

Zhou J, Chen DQ, Poon VK, Zeng Y, Ng F, Lu L, Huang JD, Yuen KY, Zheng BJ. A regulatory polymorphism in interferon-gamma receptor 1 promoter is associated with the susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. Immunogenetics. 2009 Jun;61(6):423-30. Epub 2009 Jun 2.

World Health Organization 2010. Disponível em:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

**ANEXO A**



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
 Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



**Comitê de Ética em Pesquisa**

**PARECER CONSUBSTANCIADO – 039/2010**

**Protocolo 0028.0.009.000-10**

**1. Identificação:**

**Título do Projeto:** "Identificação de marcadores (imuno) genéticos na evolução clínica para a doença de Chagas".

**Pesquisador Responsável:** Sergio Salles Xavier.

**Instituição Responsável:** Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

**Data de Apresentação ao CEP:** 15/06/2010.

**2. Sumário:**

Visa a acompanhar e correlacionar a evolução clínica e achados imunológicos e imunogenéticos em indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, estando estes na forma indeterminada ou na forma cardíaca da fase crônica da doença de Chagas. Serão incluídos pacientes atendidos ambulatorialmente no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (PEC). Esta proposta não será um estudo caso controle convencional, pois não serão incluídos indivíduos saudáveis, soro-negativos para o *T. cruzi*. Os indivíduos controle serão pacientes na forma indeterminada da doença de Chagas, pareados por sexo e idade em relação aos indivíduos com cardiopatia crônica chagásica (CCC). Levando-se em consideração que a coorte possui 789 indivíduos, serão incluídos os seguintes grupos, considerando-se para o cálculo do tamanho amostral a menor frequência (14%) para o alelo do gene de CCR2, e que será necessário a inclusão de pelo menos 10 indivíduos com este polimorfismo: Grupo 1 – (ou controle) – 216 pacientes com a sorologia positiva para o *T. cruzi*, na forma indeterminada. Serão mapeados por sexo e idade em relação aos indivíduos do grupo 2; Grupo 2 – (ou caso) 113 pacientes com sorologia positiva para o *T. cruzi*, na forma cardíaca sendo estes pertencentes ao grupo A (36 ou 13% da coorte – 264, ECG alterado e ECO normal), grupo B (36 ou 12% da coorte – 199, ECO alterado sem falha cardíaca), grupo C (25, [com expectativa de inclusão de 36 nos 3 anos do projeto] ou 48% da coorte – 52, apresentando falha cardíaca) e grupo D (16 [com expectativa de inclusão de 20 nos 3 anos do projeto] ou 2,9% da coorte – 23, com FC avançada). Espera-se com este estudo (descritivo) identificar genes que tenham associação com o agravamento da cardiopatia chagásica crônica.

**3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).**

Projeto com delineamento adequado. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em linguagem acessível ao sujeito de pesquisa. Este projeto será submetido à FAPERJ para financiamento integral.

**4. Diligências:**

Sim. Foram satisfeitas.

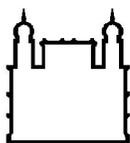
**5. Parecer: APROVADO.**

**Data:** 13 de agosto de 2010.

**Assinatura do Coordenador:**

*Lia Camilla Coura*

**Dr.ª Lia Camilla Coura**  
 Coordenadora do Comitê  
 de Ética em Pesquisa  
 IPEC / FIOCRUZ

**ANEXO B:**

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ****Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS

*PROCESSO DE CONSENTIMENTO E DOCUMENTAÇÃO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A PESQUISA***IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES (IMUNO) GENÉTICOS NA EVOLUÇÃO CLÍNICA PARA A DOENÇA DE CHAGAS**

Coordenadores: Dra. Maria da Glória Bonceni de Almeida, Dr. Alejandro Hasslocher-Moreno, Dr. Sergio Salles Xavier – IPEC

Colaboradores: Dra. Andreia Silvestre, Pedro Emmanuel Brasileiro, Ingebourg Georg – IPEC e Dra. Joseli Lannes-Vieira - IOC

**PROPOSTA E SITUAÇÃO-PROBLEMA**

Cara Sra./Srta.

Estamos convidando-o (a) a participar de uma pesquisa sobre a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas, para tentar entender se existem diferenças entre os pacientes em relação a genética de cada um e como a doença evolui em cada paciente.

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* é muito comum em nosso país e muitos indivíduos estão infectados e podem desenvolver problemas cardíacos, mesmo 10-30 anos depois da infecção. Não há ainda vacinas ou um tratamento eficaz para a forma crônica (avançada) desta doença. Para o acompanhamento desta doença o (a) senhor (a) fará rotineiramente exames de sangue (hemograma, bioquímica, sorologia) e exames no coração (eletrocardiograma e ecocardiograma). Todo o tratamento será realizado sem custo. Se o (a) senhor (a) aceitar participar do projeto, não haverá mudança no seu tratamento. Somente uma amostra de sangue será retirada, uma única vez.

## TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, estou sendo informado (a) sobre a doença de Chagas, e os procedimentos necessários para o acompanhamento desta enfermidade no IPEC-Fiocruz, bem como os exames que farei para o projeto que estou sendo convidado a participar. Fui informado também que a rotina clínica e laboratorial não mudará se desejar ou não participar desta pesquisa.

## PROCEDIMENTOS

### 1. Procedimentos

Se eu concordar em participar neste estudo, sei que:

- a) Eu concordo em realizar, a critério dos médicos, os exames de sangue e de coração.
- b) Eu permitirei que 25 mL de sangue sejam retirados para verificar a presença de fatores que determinam a progressão das lesões cardíacas (MBL, DC-SIGN, TNF, BAT1, IFN $\gamma$ , CCR5, CCR2, CCL5, M2, BETA-ADR) através de testes genéticos que serão realizados com uma amostra de DNA (material genético que fornece as características individuais de cada ser humano, animal e vegetal) extraído nesta coleta.
- c) **Fui informado que os resultados dos testes genéticos estarão disponíveis para meu conhecimento, mas que não terão poder de diagnóstico ou interferirão em meu tratamento.**
- d) É do meu conhecimento que todos os materiais usados para a coleta de sangue são descartáveis.
- e) Minha identificação será mantida em sigilo por todos os participantes.

## 2. Tempo

Para participar desta pesquisa terei que receber informações sobre o assunto, ler e assinar este Termo de Consentimento, além de colher a amostra de sangue.

## 3. Local do Estudo

Todo o acompanhamento clínico será realizado no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), sob a responsabilidade de seu médico, e o estudo do material obtido será feito no Laboratório de Imunologia também do IPEC, Fiocruz.

## 4. **Riscos/Desconfortos**

- a. A coleta de sangue normalmente não causa problemas locais. Às vezes pode ficar um pouco arroxeadado, mas isto desaparece em poucos dias.
- b. Os exames cardíacos fazem parte do acompanhamento clínico e não terão nenhuma alteração, caso eu decida ou não participar desta pesquisa.

## 5. ***Tratamento e compensação por danos***

Não há risco de qualquer problema para a minha saúde pelo fato de coletar sangue. Como não há tratamento específico para a doença de Chagas, todos os sintomas cardíacos e outros que por ventura aconteçam durante meu tratamento, serão tratados pelos médicos responsáveis.

## 6. ***Alternativas***

Se eu decidisse não participar desta pesquisa o tratamento médico a que eu tenho direito não seria prejudicado. A necessidade de fazer os exames cardíacos e de sangue ou tratamentos para outras causas, seria a mesma e o tempo de acompanhamento também seria o mesmo.

### **7. Resultados dos Testes**

Os resultados dos testes de sangue (hemograma, bioquímica e sorologia para o *Trypanossoma cruzi*) e os exames no coração serão fornecidos somente para mim pelo médico na próxima consulta. Nesta consulta, assim como na de hoje, posso fazer todas as perguntas sobre as dúvidas que tenho sobre a doença de Chagas.

### **8. Custo para os entrevistados**

Eu não pagarei nenhuma quantia de dinheiro para a participação neste estudo ou para os tratamentos que eu porventura necessite. Os custos de exames laboratoriais serão cobertos pelo estudo.

### **9. Confidenciabilidade dos dados**

Sei que todas as minhas informações são confidenciais e constarão de meu prontuário. Somente os Drs. Alejandro Hassloche-Moreno, Sergio Salles Xavier, Andreia Silvestre, Pedro Brasileiro e Maria da Glória Bonecini de Almeida, e seus assistentes terão acesso a estas informações. As informações obtidas nesta pesquisa poderão ser discutidas com pesquisadores de outras Instituições, mas nenhuma identificação minha será fornecida.

Receberei uma cópia deste consentimento para mantê-lo comigo.

Eu consinto em que meu endereço e telefone sejam anotados numa folha separada, para facilitar contato comigo quando necessário.

Nos próximos dias, se tiver qualquer dúvida, sobre sua participação deste estudo, favor telefonar para 3865 9531 ou 3865 9644 (Dra. Maria da Glória, Dr. Alejandro Hasslocher e Dr. Sérgio Salles Xavier)

Local e data: \_\_\_\_\_

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_

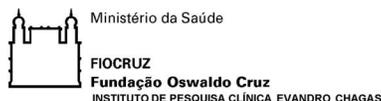
Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome de alguma pessoa que possa ser contactada, caso a Sr(a) não possa fornecer o seu endereço ou telefone no momento:

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

**ANEXO C:**



## IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES (IMUNO) GENÉTICOS NA EVOLUÇÃO CLÍNICA PARA A DOENÇA DE CHAGAS

Coordenadores: Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida, Dr. Alejandro Hasslocher-Moreno, Dr. Sergio Salles Xavier – IPEC

Colaboradores: Dr. Marcelo T. Holanda (IPEC), Dra. Andreia Silvestre, Dr. Pedro Emmanuel Brasileiro, Dr. Luis Henrique Sangeris (IPEC), Ingebourg Georg – IPEC e Dra. Joseli Lannes-Vieira - IOC

### QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Número:..... Prontuário: ..... Data Nascimento: ...../...../.....

ESTÁGIO:  Indeterminado  A  B1  B2  C  D

Nome: .....

1- Qual o Estado de nascimento? ..... 2- Cidade Nascimento:.....

3- Por quanto tempo viveu no Estado onde nasceu?  <5a  5-10a  10-15a  15-20a  >20a

4- Ainda reside lá?  Sim  Não

5- Alguma vez retornou ao Estado de nascimento?  Sim  Não

6- Qual o período de permanência?  <1mês  1-6meses  6m-1a  >1a

7- Já viajou para outros Estados para residir?  Sim  Não Qual? \_\_\_\_\_

8- Recebeu transfusão sanguínea ?  Sim  Não

9- Possui parentes portadores da doença de Chagas?  Sim  Não

10- Algum dos parentes veio a falecer por Chagas?  Sim  Não

11- Há quanto tempo está no IPEC?  <5a  5-10a  10-15a  15-20a  >20a

Portador de: 12- HAS?  Sim  Não 13- DM?  Sim  Não 14- Dislipidemia?  Sim  Não

15- ECG:

Normal  BAV 1G  BAV 2G M1  BAV 2G M2  BAVT

HBAE  BRD 1G  BRD 2G  BRD 3G

BRE 1G  BRE 2G  BRE 3G

HBAE + BRD 1G  HBAE + BRD 2G  HBAE + BRD 3G

BAV 1G + HBAE + BRD 2G  Arritmia sinusal  BAV 1G + HBAE + BRD 3G

ESV isolada  ESV monomórficas  ESV polimórficas

ZEI  FA  Flutter

ADRV  Outro: \_\_\_\_\_

16-ECO AO: \_\_\_\_\_ AE: \_\_\_\_\_ SIV: \_\_\_\_\_ PP: \_\_\_\_\_ VEd: \_\_\_\_\_ VEs: \_\_\_\_\_ FEt: \_\_\_\_\_ FEs: \_\_\_\_\_

Normal  disf Leve  disf Moderada  disf Grave

Hipocinesia  difusa  anterior  inferior  posterior  lateral  septal

basal  médio  apical

Acinesia  anterior  inferior  posterior  lateral  anterior  septal

basal  médio  apical

Aneurisma  apical  infero-basal  outro: \_\_\_\_\_

Trombo  SIM  discinesia \_\_\_\_\_