

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM SAÚDE PÚBLICA

ROMERO HENRIQUE TEIXEIRA VASCONCELOS

ASSOCIAÇÃO ENTRE AS FORMAS CLÍNICAS CRÔNICAS DA DOENÇA DE
CHAGAS E OS NÍVEIS SÉRICOS DE IMUNOGLOBULINA A FRENTE AOS
ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E FRA DE *Trypanosoma cruzi*

RECIFE
2009

ROMERO HENRIQUE TEIXEIRA VASCONCELOS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS FORMAS CLÍNICAS CRÔNICAS DA DOENÇA DE
CHAGAS E OS NÍVEIS SÉRICOS DE IMUNOGLOBULINA A FRENTE AOS
ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E FRA DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

Co-orientadora: Dra. Yara de Miranda Gomes

RECIFE

2009

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

V331a Vasconcelos, Romero Henrique Teixeira.

Associação entre as formas clínicas crônicas da doença de chagas e os níveis séricos de imunoglobulina A frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* / Romero Henrique Teixeira Vasconcelos. — Recife: R. H. T. Vasconcelos, 2009.

71 f.: il.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

Orientadora: Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes, co-orientadora: Dra. Yara de Miranda Gomes.

1. Doença de Chagas. 2. Imunoglobulina A. 3. *Trypanosoma cruzi*. I. Moraes, Clarice Neuenschwander Lins de. II. Gomes, Yara de Miranda. III. Título.

CDU 616.937

ROMERO HENRIQUE TEIXEIRA VASCONCELOS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE AS FORMAS CLÍNICAS CRÔNICAS DA DOENÇA DE
CHAGAS E OS NÍVEIS SÉRICOS DE IMUNOGLOBULINA A FRENTE AOS
ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E FRA DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, para avaliação pela seguinte banca examinadora:

Data de aprovação: 28/Outubro/2009

Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva
Departamento de Imunologia do CPqAM/Fiocruz

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes
Departamento de Imunologia do CPqAM/Fiocruz

Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro
Departamento de Imunologia do CPqAM/Fiocruz

A Clarice Neuenschwander e Yara Gomes.

A Eulalia Maria e Rafael Gustavo.

Aos portadores da Doença de Chagas.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por toda a infra-estrutura disponibilizada para a realização desta dissertação, desde os reagentes e equipamentos até a viatura para locomoção até o Ambulatório de Doença de Chagas.

Ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Saúde Pública, em especial à coordenação do Mestrado Acadêmico, não só pelo suporte acadêmico e financeiro, mas também por todo apoio e amparo que me foram dados.

A todos que fizeram parte da Secretaria Acadêmica enquanto fui aluno do mestrado, em especial a Nilda, Joselice, Janice e Luana, por terem resolvido “todos os meus problemas”.

Aos meus colegas e amigos do Mestrado Acadêmico (Turma 2008-2010), por todos os momentos de aprendizado, alegria e diversão que me proporcionaram. Vocês serão os melhores “sanitaristas” que a bancada, o serviço e a política poderão ter.

À Fundação Oswaldo Cruz e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa a mim concedida durante o mestrado.

Ao Departamento de Genética da UFPE, em especial à Mônica Carvalho, pelo apoio e confiança durante a realização do Estágio de Docência.

À Bio-Manguinhos, pelo fornecimento dos antígenos utilizados nesta dissertação.

A todos os que fazem parte do Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, em especial a Dra. Glória e a Val, pela permissão e ajuda na seleção dos pacientes chagásicos.

Aos pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis que participaram deste estudo, pois sem eles esta dissertação não estaria concluída.

Aos membros da banca examinadora da qualificação e da dissertação pela avaliação e pelas sugestões feitas com o intuito de melhorar o conteúdo desta dissertação.

Aos meus familiares, em especial a Mainha e ao meu irmão, pelo amor, apoio e incentivo que me dão para tornar os meus sonhos em realidade.

Aos meus amigos do Colégio Damas, em especial a Yú, Gabi, Tati, Duca, Ney, Bia e Rodrigo (Papa-Hóstia), e aos da turma de Biomedicina 2007.1 da UFPE, por compreenderem as ausências nos encontros, nas farras e saídas do dia-a-dia.

Aos colegas e amigos que fizeram parte do antigo Departamento de Biologia Celular e aos que fazem parte do Departamento de Imunologia pela agradável convivência diária.

E, por último, meu maior agradecimento é para todos os que formam o Grupo de Pesquisa em Doença de Chagas do Departamento de Imunologia, em especial a Fábio Neves, pela amizade e dedicação junto a este trabalho. E com um carinho todo especial à Dra. Clarice (Cla/Penélope/Ori) e a Dra. Yara por terem me aceitado como seu aluno. Os valores éticos, morais e científicos que aprendi com vocês não têm mestrado no mundo que possa ensinar. Sou eternamente grato por tudo que fizeram por mim e tenho muito orgulho de fazer parte da equipe de vocês.

*“Posso, tudo posso, Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir...
Vou perseguir, tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou insistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória”
(Celina Borges)*

VASCONCELOS, R. H. T. **Associação entre as formas clínicas crônicas da doença de Chagas e os níveis séricos de Imunoglobulina A frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi***. 2009. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

RESUMO

A doença de Chagas é uma patologia largamente distribuída pelo continente americano, onde afeta milhões de indivíduos e apresenta relevantes implicações médicas, sociais e econômicas. Clinicamente, a doença apresenta uma diversidade de manifestações. Na fase crônica da doença, os indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* podem ser assintomáticos ou podem apresentar complicações cardíacas e/ou digestivas. Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento e manutenção das formas clínicas crônicas da infecção chagásica. A resposta a isotipos específicos tem sido associada às diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas. Com o objetivo de estabelecer um perfil isotípico capaz de diferenciar as formas clínicas da doença de Chagas, este estudo se propôs a investigar os níveis séricos de IgA no soro de pacientes chagásicos frente a dois antígenos recombinantes do *T. cruzi*. Para tanto, foram coletadas amostras de soro de 96 pacientes chagásicos selecionados no Hospital Universitário Oswaldo Cruz. Também foram coletadas amostras de soro de 14 indivíduos saudáveis, para estabelecimento do *cut-off*. Para detecção da IgA, placas de ELISA foram sensibilizadas com os antígenos recombinantes CRA ou FRA de *T. cruzi*. As amostras de soro foram depositadas em duplicata nos poços e a ligação dos anticorpos específicos foi detectada através do complexo biotina-estreptavidina-peroxidase. Os resultados foram expressos na forma de índices de reatividade. Verificou-se que os pacientes chagásicos apresentaram níveis séricos variados de IgA frente aos antígenos CRA e FRA. Entretanto, este isotipo específico para os dois antígenos recombinantes foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos portadores das formas digestiva e mista, pelos seus níveis séricos elevados, daqueles portadores das formas indeterminada e cardíaca. Ao avaliar o desempenho deste teste, observou-se que ele apresenta elevada especificidade e elevado valor preditivo positivo, podendo ser utilizado, após confirmação destes resultados em um estudo prospectivo, como um marcador de evolução clínica para as manifestações digestivas da doença de Chagas. A investigação de alterações precoces no sistema digestivo com marcadores séricos pode ser uma boa maneira de auxiliar os médicos no acompanhamento e redirecionamento das condutas terapêuticas de pacientes chagásicos crônicos.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Imunoglobulina A, *Trypanosoma cruzi*

VASCONCELOS, R. H. T. **Association between the chronic clinical forms of Chagas disease and serum levels of Immunoglobulin A against the CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi***. 2009. Dissertation (Academic Master's Degree in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

ABSTRACT

Chagas disease is widely distributed throughout the American continent, where affects millions of individuals and presents significant medical, social and economic implications. Clinically, the disease presents a variety of manifestations. In the chronic phase of the disease, the individuals infected by *Trypanosoma cruzi* may have the absence of symptomology or may present cardiac and/or digestive complications. Several studies have demonstrated the involvement of the immune response in the development and maintenance of chronic clinical forms of Chagas disease. It is known that the response to specific isotypes has been associated to different clinical manifestations of Chagas disease. The aim of this study was to investigate if serum levels of IgA in serum of chagasic patients against two recombinant antigens of *T. cruzi* were able to establish an isotype profile able to differentiate the clinical forms of Chagas disease. Serum samples from 96 chagasic patients selected at the Oswaldo Cruz University Hospital were collected. Serum samples from 14 healthy individuals were also collected to establish the cut-off point. In order to detect IgA, wells of ELISA plates were coated with the antigens CRA or FRA of *T. cruzi*. Serum samples were added in duplicate to each well and specific binding was detected using the biotin-streptavidin-peroxidase complex. The results were expressed in the form of a reactivity index. It was found that chagasic patients have varying levels of IgA against the CRA and FRA antigens. However, this specific isotype for the both recombinant antigens was able to differentiate patients with digestive and cardio-digestive forms of Chagas disease, by their elevated serum levels, from those with the indeterminate and cardiac forms. The diagnostic performance of this test shows that it has high specificity and high positive predictive value, so, after confirmation of these findings in a prospective study, it can be used as an immunological marker for the digestive involvement of Chagas disease. The investigation of early alterations in the digestive system using serum markers could improve management and treatment of chronic chagasic patients.

Key words: Chagas disease, Immunoglobulin A, *Trypanosoma cruzi*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial da doença de Chagas.....	19
Figura 2	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3	Evolução clínica da doença de Chagas humana.....	23
Figura 4	Fluxograma de confirmação do diagnóstico etiológico nos pacientes chagásicos.....	42
Figura 5	Índices de reatividade de IgA, frente ao antígeno recombinante CRA de <i>T. cruzi</i> , em pacientes chagásicos crônicos.....	45
Figura 6	Índices de reatividade de IgA, frente ao antígeno recombinante FRA de <i>T. cruzi</i> , em pacientes chagásicos crônicos.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características epidemiológicas dos pacientes com a forma indeterminada.....	37
Tabela 2	Características epidemiológicas dos pacientes com a forma cardíaca.....	38
Tabela 3	Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com a forma digestiva.....	39
Tabela 4	Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com a forma mista.....	40
Tabela 5	Desempenho do ELISA para detecção de IgA frente aos antígenos recombinantes CRA ou FRA de <i>T. cruzi</i> em amostras de soro de pacientes chagásicos com dano digestivo.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BENEFIT	<i>Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BSA	Albumina Bovina Sérica
CARD	Forma Cardíaca
CD	Grupamento de Diferenciação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CO	<i>Cut-off</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CRA	Antígeno Repetitivo Citoplasmático
DIG	Forma Digestiva
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
DO	Densidade óptica
EIE	Ensaio Imunoenzimático
ELISA	Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
FRA	Antígeno Repetitivo Flagelar
HAI	Hemaglutinação Indireta
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IC	Intervalo de Confiança
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	<i>Interferon-gamma</i>
Ig	Imunoglobulina
IGN	Informação ignorada

IL	Interleucina
IND	Forma Indeterminada
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
MC	Megacólon
ME	Megaesôfago
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIS	Forma Mista
MS	Ministério da Saúde
NESC	Departamento de Saúde Coletiva
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Tampão Fosfato-Salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SRDC	Serviço de Referência em Doença de Chagas
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TA	Temperatura ambiente
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
Th	Linfócito T auxiliar
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
UPE	Universidade de Pernambuco
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 ASPECTOS GERAIS SOBRE A DOENÇA DE CHAGAS.....	18
2.1 História.....	18
2.2 Epidemiologia.....	19
2.3 Transmissão.....	21
2.4 Manifestações Clínicas e Laboratoriais.....	22
2.5 Diagnóstico.....	24
2.6 Tratamento.....	25
2.7 Aspectos Imunológicos.....	26
2.8 Marcadores de Prognóstico.....	27
2.9 Antígenos Recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i>	28
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 PERGUNTA CONDUTORA.....	32
5 HIPÓTESE.....	33
6 OBJETIVOS.....	34
6.1 Objetivo Geral.....	34
6.2 Objetivos Específicos.....	34
7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	35
7.1 Desenho e população de estudo.....	35
7.2 Avaliação dos pacientes.....	36
7.3 Aspectos éticos.....	40
7.4 Obtenção das amostras.....	41
7.5 Diagnóstico etiológico confirmatório.....	41
7.6 Antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>T. cruzi</i>	42
7.7 Detecção de IgA frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA.....	43
7.8 Análise estatística.....	44
8 RESULTADOS.....	45
8.1 Análise do isotipo IgA frente ao antígeno CRA.....	45
8.2 Análise do isotipo IgA frente ao antígeno FRA.....	46
8.3 Desempenho do ELISA para detecção de IgA frente aos antígenos CRA e FRA..	47

9 DISCUSSÃO.....	48
10 CONCLUSÕES.....	54
11 PERSPECTIVAS.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICES.....	66
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente Chagásico.....	66
Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduo Saudável.....	67
Apêndice C - Questionário de Pesquisa.....	68
Apêndice D - Participação em congressos e resumos publicados.....	69
ANEXO.....	70
Anexo A - Parecer de Aprovação do CEP-CPqAM/Fiocruz.....	70

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma patologia largamente distribuída pelo continente americano, onde afeta milhões de indivíduos e apresenta relevantes implicações médicas, sociais e econômicas (JUNQUEIRA JUNIOR, 2006). Estima-se que a prevalência mundial da doença de Chagas é de cerca de 12 milhões de casos e que aproximadamente 28 milhões de pessoas estão sob o risco da infecção (DIAS *et al.*, 2008).

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um patógeno intracelular obrigatório, que infecta vários tipos celulares, principalmente macrófagos, fibroblastos, células do miocárdio, glias e reticuloendoteliais (LIEKE *et al.*, 2006). O agente etiológico é transmitido entre humanos através de insetos hematófagos, popularmente conhecidos pelo nome de barbeiros. A transmissão também pode ocorrer sem a intervenção do vetor, por via transfusional, congênita, oral, por transplantes de órgãos contaminados ou acidentes de laboratórios (LANA; TAFURI, 2005).

As manifestações clínico-laboratoriais da doença a dividem em duas fases, uma aguda e a outra crônica. A fase aguda dura, em média, de um a três meses após a infecção e é caracterizada por uma intensa parasitemia e baixos níveis de anticorpos, sendo imperceptível em grande parte dos indivíduos, devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas. Os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* que passam pela fase aguda da doença entram na fase crônica, que é marcada pela escassez de parasitos no sangue e pelos elevados títulos de anticorpos (GOMES, 1996). A expressão clínica da doença Chagas em sua fase crônica varia de pacientes assintomáticos até cardiopatas com falha cardíaca grave ou a formação de megasôfago e/ou megacólon (LANA; TAFURI, 2005).

A progressão da infecção chagásica e o desenvolvimento de diferentes formas clínicas, com diferentes graus de gravidade, estão relacionados à complexa relação existente entre o parasito e o hospedeiro. Embora muitos conhecimentos tenham sido adquiridos em relação à imunopatologia da doença de Chagas, importantes aspectos ainda não foram esclarecidos. Pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que favorecem a predisposição a uma determinada forma clínica nos indivíduos chagásicos crônicos (DUTRA *et al.*, 2005).

Estudos prévios sugerem a existência de uma relação entre o reconhecimento específico de antígenos do parasito e a resposta imune gerada pelo hospedeiro frente a esses antígenos, com as formas clínicas da doença. Portanto, a detecção de um isotipo particular de

anticorpo pode ser um dos fatores correlacionados com as manifestações clínicas da infecção chagásica (MORGAN *et al.*, 1998).

Com o objetivo de diferenciar os pacientes chagásicos com potencial de evolução para as formas clínicas severas, alguns grupos de pesquisa tentam associar um padrão de imunoglobulinas frente a um ou mais antígenos de *T. cruzi* que sejam capazes de diferenciar as formas clínicas e prever seu potencial evolutivo (CORDEIRO *et al.*, 2001; MICHAILOWSKY *et al.*, 2003; ZAUZA; BORGES-PEREIRA, 2001). Primavera *et al.* (1988), por exemplo, sugerem que a presença de anticorpos IgA específicos para a forma amastigota do parasita está relacionada com o desenvolvimento de manifestações digestivas. No entanto, apesar de alguns trabalhos terem estudado a resposta imune humoral de pacientes chagásicos crônicos, existe uma grande diversidade de resultados obtidos, provavelmente porque poucos estudos foram realizados com antígenos puros de *T. cruzi*.

A utilização de antígenos puros e quimicamente definidos e que sejam específicos do parasito é sugerida por alguns autores como um meio seguro para fornecer uma maior confiabilidade aos resultados na identificação de moléculas-chave desta complexa interação parasito-hospedeiro (CERBAN *et al.*, 1993; LORCA *et al.*, 1992; MOTRAN *et al.*, 1994).

Através desta abordagem, o presente estudo se propôs a investigar a resposta imune humoral de pacientes chagásicos crônicos frente a dois antígenos recombinantes do *T. cruzi*, na tentativa de relacioná-la com as formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Esses dois antígenos, obtidos através da tecnologia do DNA recombinante, apresentam uma estrutura de epítopos repetitivos e tiveram sua nomenclatura definida de acordo com a sua localização celular. São eles o *Cytoplasmic Repetitive Antigen* (CRA), expresso no citoplasma das formas epimastigota e amastigota do *T. cruzi*, e o *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA), localizado na região do flagelo adjacente ao corpo das formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi* (KRIEGER *et al.*, 1992).

Verçosa *et al.* (2007), estudaram o perfil isotípico das Imunoglobulinas G (IgGs) de pacientes chagásicos crônicos frente aos antígenos CRA e FRA e observaram que o isotipo IgG2 é capaz de diferenciar indivíduos chagásicos com manifestações cardíacas da doença daqueles assintomáticos quando se utiliza o antígeno recombinante FRA. Os autores sugerem que este isotipo pode servir como um provável marcador de evolução clínica para o dano cardíaco. No entanto, até o presente momento, não se sabe se os demais isotipos de imunoglobulinas podem ser utilizados para fazer associações com o estado clínico dos pacientes, diante da utilização dos antígenos recombinantes CRA e FRA.

Assim, considerando que o desenvolvimento de uma resposta imune humoral específica para antígenos de *T. cruzi* pode estar relacionada com a progressão para as formas clínicas da doença de Chagas e que os antígenos recombinantes CRA e FRA podem ser utilizados para fazer esta associação, a proposta deste trabalho foi investigar os níveis séricos de IgA em pacientes chagásicos crônicos frente a estes antígenos e associá-los com as diferentes manifestações clínicas da doença.

2 ASPECTOS GERAIS SOBRE A DOENÇA DE CHAGAS

2.1 História

Em 1909, Carlos Chagas, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença humana, a tripanossomíase americana. No ano anterior, Chagas já havia sido capaz de identificar seu agente causal - o protozoário flagelado que denominou de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz - e o inseto transmissor, conhecido como barbeiro. A “tripla descoberta” de Chagas, considerada única na história da medicina, constitui um marco na história da ciência brasileira (KROPF, 2000). Posteriormente, a doença foi então denominada mal de Chagas, enfermidade de Chagas ou simplesmente doença de Chagas.

A descoberta desta doença foi uma das mais completas e bem sucedidas do ponto de vista global na história da medicina. O trabalho de Carlos Chagas é único e lhe conferiu duas indicações oficiais à maior premiação mundial em ciência, o Nobel, em 1913 e 1921. Admite-se que a não premiação do genial cientista em 1913 possa ter ocorrido em razão da forte oposição que ele enfrentou no Brasil por parte de alguns médicos e pesquisadores da época, que chegaram a questionar a existência da doença de Chagas, e que, portanto, teriam influenciando a decisão do Comitê Nobel para não premiá-lo. Em 1921, ocorreu um fato estranho: não houve prêmio Nobel para a área de Fisiologia ou Medicina e Carlos Chagas teria sido o único cientista indicado à premiação nesse ano (PITTELLA, 2009).

Apesar de não ter sido condecorado com o Nobel, Carlos Chagas teve seu trabalho reconhecido e admirado por vários pesquisadores e instituições nacionais e internacionais, tendo sido laureado com inúmeras distinções (PITTELLA, 2009). Em 2009, através de vários eventos promovidos pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), se comemorou o centenário de descoberta da doença de Chagas, onde se prestaram várias homenagens ao brilhante cientista brasileiro por sua descoberta e pelas suas contribuições no estudo da infecção pelo *T. cruzi*.

2.2 Epidemiologia

Apesar de estarmos no ano centenário de seu descobrimento e de muitos avanços terem sido realizados no combate a doença de Chagas, principalmente o controle vetorial, esta patologia ainda representa um grande problema de saúde pública. Esta enfermidade é circunscrita à América Latina, sendo considerada endêmica em 18 países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002) (Figura 1). Segundo estimativa de Dias *et al.* (2008), a prevalência atual da infecção humana pelo *T. cruzi* é de cerca de 12 milhões de casos e aproximadamente 28 milhões de pessoas estariam sob o risco de contrair a infecção.



Nature Reviews | Microbiology

Figura 1. Distribuição mundial da doença de Chagas
Fonte: Morel; Lazdins (2003)

A doença de Chagas constituiu por vários anos, desde sua descrição, uma endemia predominantemente rural, de distribuição exclusiva nas Américas, atingindo áreas específicas, intimamente associadas ao subdesenvolvimento social e econômico. Migrações para áreas urbanas durante as três últimas décadas do século XX mudaram o padrão epidemiológico tradicional, passando ser a doença também uma endemia urbana. Atualmente, a doença de

Chagas é um problema mundial, com diversos casos notificados em países considerados não endêmicos, como Espanha, Estados Unidos e Canadá, os principais destinos dos imigrantes latinos. Problemas econômicos e políticos estimulam a migração e favorecem a propagação da doença dos países endêmicos para os países desenvolvidos. Nos países não endêmicos, a transmissão ocorre principalmente por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e através da via congênita (PIRON *et al.*, 2008; SCHMUNIS, 2007).

Em 1950, o Brasil iniciou seu Programa Nacional de Controle Vetorial da Doença de Chagas, tendo alcançado sua maior cobertura nas décadas de 70 e 80. Na década de 70 foi delimitada a área onde havia risco de transmissão para o restante do país, através de inquéritos entomológicos e de soroprevalência da infecção na população humana, já como parte da rotina de operações para o controle da endemia. Em meados dos anos 80, com o programa francamente consolidado, o impacto foi altamente positivo, com redução drástica dos índices triatomínico-tripanosômicos ao longo da área endêmica (DIAS *et al.*, 2008). Desapareceram os jovens e crianças infectados, chegou-se a um rigoroso controle transfusional, e a prevalência da infecção baixou consideravelmente. Em junho de 2006, o Brasil recebeu uma certificação relativa à eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor (*Triatoma infestans*) e pela via transfusional, concedida pela OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde) (DIAS, 2006).

Com o sucesso das medidas adotadas para o controle das transmissões vetorial e transfusional, estima-se hoje que o Brasil possua de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (DIAS *et al.*, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). As medidas de controle adotadas modificaram consideravelmente a epidemiologia da doença, não só no que diz respeito à sua prevalência e incidência, mas também às suas formas de transmissão. Estudos atuais mostram prevalência da infecção humana no Brasil inferior a 0,2%, sendo o perfil epidemiológico do paciente com doença de Chagas o de um indivíduo adulto, de origem rural, de baixo nível instrucional e vivendo em centros urbanos no chamado extrato terciário de trabalho (DIAS, 2007).

A mortalidade precoce e invalidez causada pela doença de Chagas resultam em uma perda econômica devastadora nas Américas. Em 1995, esta perda foi estimada em 8 milhões de dólares, que é equivalente a 2,5% da dívida externa da América Latina. No Brasil, entre 1979 e 1981, cerca de 300 milhões de dólares foram gastos com o acompanhamento e tratamento de pacientes chagásicos, segundo estimativa baseada no número total de casos da doença no período (MONCAYO, 2003). De acordo com Hotez *et al.* (2007), 14 mil mortes

anuais estão associadas a doença de Chagas globalmente, constituindo esta endemia a sexta doença tropical negligenciada mais importante do mundo.

A ausência de políticas públicas voltadas para o desenvolvimento de ações para os casos crônicos impede a implantação de estratégias para notificar, quantificar e qualificar as informações. Da mesma forma, a falta de notificação compulsória impossibilita qualquer estimativa mais acurada de prevalência e incidência, desconhecendo-se assim a real dimensão do problema no Brasil e no mundo atualmente. (COURA; DIAS, 2009)

2.3 Transmissão

A forma clássica de transmissão da doença de Chagas, como descrita por Carlos Chagas, é a vetorial, através de insetos hematófagos, da família Reduviidae, pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, que são popularmente conhecidos como barbeiros ou ainda, “chupança”, “bicudo”, “chupão” ou “procotó” (Figura 2) (LANA; TAFURI, 2005).

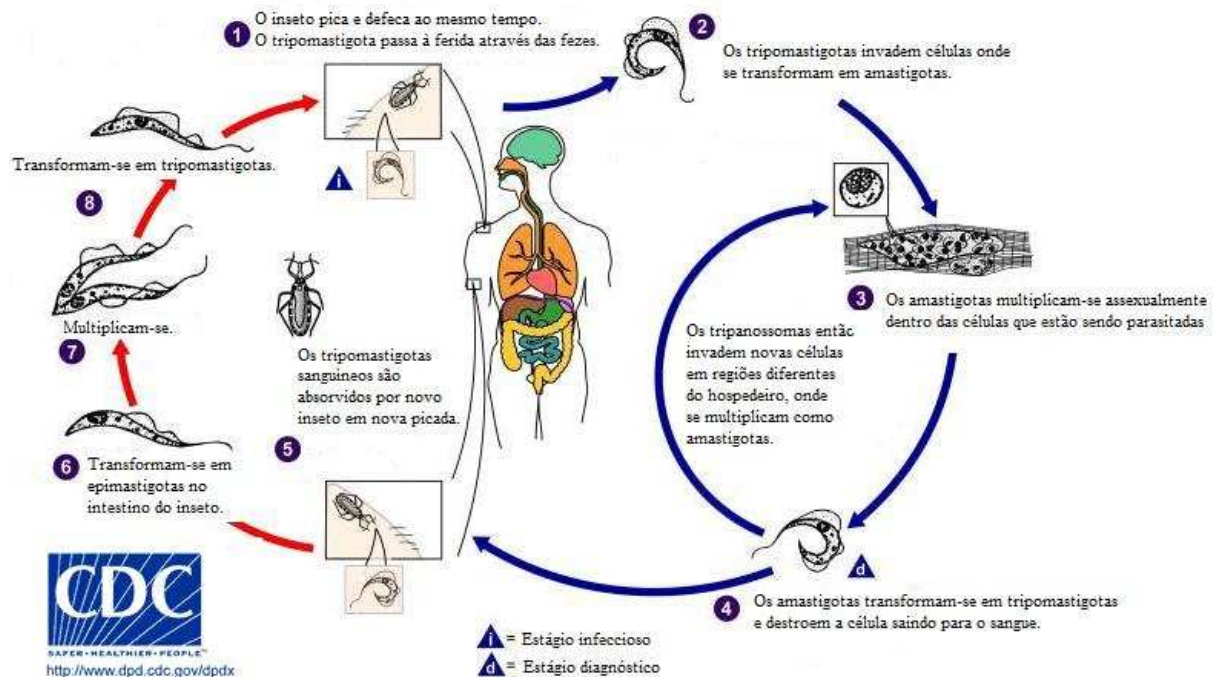


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*
Fonte: Adaptado de Center for Disease Control and Prevention (2009)

A infecção também pode ser transmitida através de transfusão sanguínea e por transplante de órgãos contaminados, que constituem o segundo mecanismo de importância epidemiológica na transmissão mundial do *T. cruzi*. O terceiro mecanismo com grande importância na transmissão da doença de Chagas é a transmissão vertical ou congênita (SCHMUNIS, 2007).

Existem ainda outras vias de transmissões secundárias, como acidentes de laboratório e pela via oral, através da ingestão de água ou alimentos contendo fezes contaminadas de barbeiro (DIAS, 1999; PUNUKOLLU *et al.*, 2007). No Brasil, relatos recentes demonstraram surtos de contaminação oral pela ingestão de açaí e caldo de cana (STEINDEL *et al.*, 2008). Existem ainda relatos do encontro de tripomastigotas em sangue menstrual de mulheres chagásicas. Entretanto, a via de transmissão sexual nunca foi comprovada na espécie humana (LANA; TAFURI, 2005).

2.4 Manifestações Clínicas e Laboratoriais

De acordo com suas manifestações clínicas e laboratoriais, a doença de Chagas é dividida em duas fases: aguda e crônica (Figura 3). A fase aguda dura, em média, de um a três meses após a infecção e é caracterizada laboratorialmente por uma intensa parasitemia e por baixos níveis de anticorpos (GOMES, 1996). Esta fase pode ser sintomática ou assintomática. Quando sintomática, as manifestações surgem, em geral, de 7 a 10 dias após a infecção pelo *T. cruzi*. Os indivíduos apresentam febre, edema localizado ou generalizado, mal-estar e cefaléia. O sinal de Romana, um edema unilateral bi-palpebral, e o chagoma de inoculação são manifestações locais que ocorrem conforme a entrada do parasito no organismo hospedeiro. Algumas manifestações sistêmicas como hepatomegalia, esplenomegalia e alterações nervosas também podem estar presentes na fase aguda da doença. No entanto, a fase aguda é imperceptível em grande parte dos indivíduos, devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas (LANA; TAFURI, 2005).

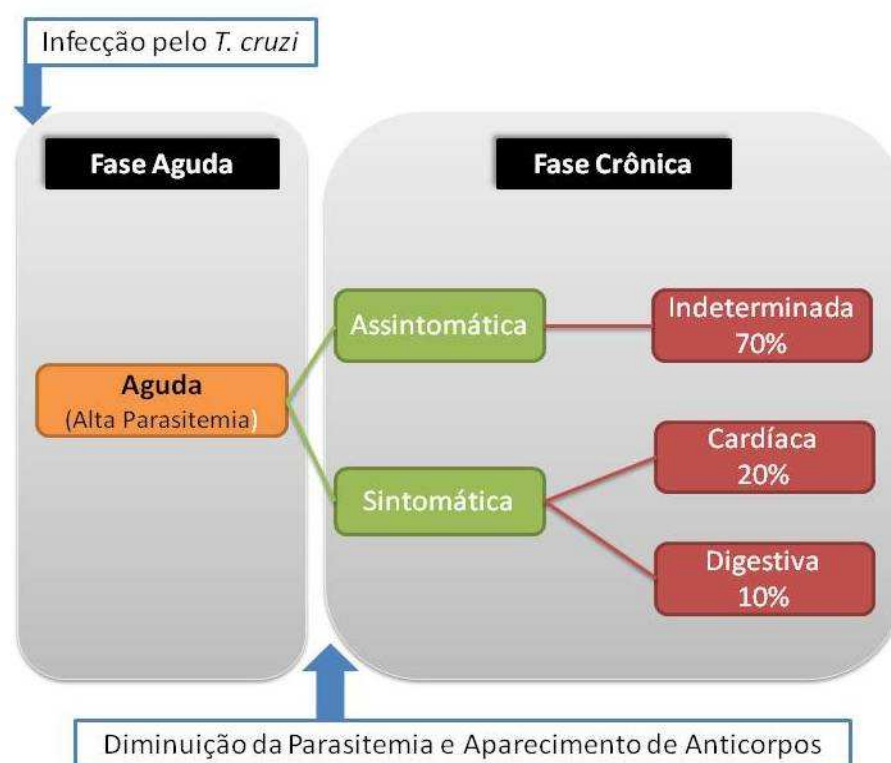


Figura 3. Evolução clínica da doença de Chagas humana
 Fonte: Adaptado de Dutra *et al.*, 2009

Os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* após passarem pela fase aguda da doença podem apresentar, após um período variável de tempo, uma das formas clínicas crônicas. Estas formas são marcadas pela escassez de parasitos no sangue e pelos elevados títulos de anticorpos (GOMES, 1996). O indivíduo chagásico que permanece por um longo período de latência clínica tem a forma chamada indeterminada (IND), que pode durar de dez a trinta anos ou por toda a vida do doente. Na forma IND da fase crônica os indivíduos chagásicos são assintomáticos, com eletrocardiograma e estudo radiológico do coração, esôfago e cólons normais, mas a sorologia é positiva. Esta forma tem particular interesse médico-social e trabalhista pelo fato de indivíduos chagásicos, assintomáticos e, em plena faixa produtiva da vida, serem excluídos do mercado de trabalho (OLIVEIRA JR., 1991; OLIVEIRA JR., 2009).

Aproximadamente 30% dos indivíduos chagásicos crônicos apresentam manifestações clínicas relacionadas ao envolvimento de órgãos como o coração, esôfago e/ou cólon, caracterizando as formas crônicas sintomáticas da doença de Chagas, que são a forma cardíaca (CARD), a forma digestiva (DIG) e a forma mista (MIS) (DUTRA *et al.*, 2009). A forma CARD é responsável por um maior número de óbitos da doença e é caracterizada por uma síndrome de insuficiência cardíaca congestiva, predominantemente arritmica, onde a

morte súbita pode ser a primeira manifestação. O bloqueio de ramo direito é a alteração mais freqüente do ponto de vista eletrocardiográfico. Patologicamente, o aneurisma apical do ventrículo esquerdo é a lesão característica da doença (ANDRADE, 1996). A forma DIG da doença é caracterizada pela dilatação de vísceras ocas, com formação de megavísceras, sendo o megaesôfago e o megacólon as mais encontradas. O megaesôfago se manifesta comumente com disfagia e o megacólon com constipação (REZENDE; MOREIRA, 2000). Indivíduos chagásicos com a forma MIS são portadores de cardiopatia de origem por doença de Chagas e megaesôfago e/ou megacólon simultaneamente (LANA; TAFURI, 2005).

Menos freqüentemente são observadas alterações no sistema nervoso, com o encontro de alterações de motricidade, de coordenação e psiquismo, que caracterizam a forma clínica nervosa da doença (PRATA, 2001). O estudo desta forma crônica da infecção chagásica ganhou maior interesse em indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes com neoplasias ou submetidos a transplantes, bem como os co-infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que desenvolvem a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), pois estes desenvolvem graves alterações no sistema nervoso. As principais alterações neurológicas nesses indivíduos são meningoencefalite, hipertensão intracraniana, meningite, perda progressiva da consciência, dores de cabeça e convulsões (SARTORI *et al.*, 2007).

2.5 Diagnóstico

Na fase aguda da doença de Chagas, o diagnóstico etiológico é baseado na detecção do parasita através de métodos parasitológicos diretos. O exame de sangue a fresco, o esfregaço sanguíneo, a gota espessa e o método de Strout são as técnicas parasitológicas mais empregadas para o diagnóstico nesta fase da doença (GOMES, 1996).

O diagnóstico parasitológico na fase crônica torna-se comprometido em virtude da escassez de parasitas. Nessa fase podem ser realizados métodos parasitológicos indiretos, como o xenodiagnóstico e/ou a hemocultura, no entanto, estas técnicas apresentam baixa sensibilidade, resultando em grande número de resultados falso-negativos (GOMES, 1997).

Na fase crônica da doença de Chagas, o diagnóstico laboratorial deve ser realizado preferencialmente através de métodos imunológicos. Esses métodos se baseiam na detecção

de anticorpos anti-*T. cruzi* do isotipo IgG que se ligam especificamente a antígenos do parasita (GOMES, 1996). Podem ser utilizadas as técnicas de hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), ou ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*). Segundo o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (BRASIL, 2005), para um diagnóstico sorológico confiável, é necessário obter resultados concordantes em pelo menos dois testes sorológicos de princípios metodológicos ou preparações antigênicas diferentes.

O diagnóstico molecular, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo padronizado atualmente, como um método de pesquisa direta do DNA do parasito no sangue. O diagnóstico através da PCR se baseia na amplificação de seqüências nucleotídicas específicas do *T. cruzi* (GOMES, 1996). Apesar do número de parasitos circulantes nos indivíduos chagásicos crônicos ser extremamente baixo, a técnica de PCR tem se demonstrado bastante sensível e eficaz para o diagnóstico da infecção chagásica nesta fase da doença. Segundo Britto (2009), a maior vantagem de se estabelecer a PCR para diagnóstico da doença de Chagas é a possibilidade de sua utilização como critério de cura terapêutica, visto que as técnicas convencionais não permitem esta aplicação.

2.6 Tratamento

Até o presente momento, não existe um medicamento comprovadamente eficaz para o tratamento etiológico da doença de Chagas. Os antiparasitários tradicionalmente utilizados, Nifurtimox e Benzonidazol, são parcialmente eficazes, tendo sua maior eficácia terapêutica apenas na fase aguda da infecção. Ambas as drogas atuam nas formas tripomastigotas no sangue, porém, são pouco efetivas contra amastigotas no tecido. Por essa razão é que sua eficácia na fase crônica estaria comprometida (CANÇADO, 1985).

Através de um estudo experimental, foi demonstrado que o uso do Benzonidazol na forma IND previne o desenvolvimento de cardiomiopatia crônica grave, apesar de não ocorrer erradicação completa do parasita (GARCIA *et al.*, 2005). Atualmente, um estudo multicêntrico denominado BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) está sendo realizado a fim de avaliar a eficácia do tratamento com Benzonidazol na doença de Chagas crônica, em humanos (MARIN-NETO *et al.*, 2009).

Há mais de 25 anos não são produzidos novos fármacos com maior eficácia e menos efeitos colaterais do que as duas únicas drogas ainda utilizadas no tratamento etiológico da doença de Chagas (SANTOS *et al.*, 2004). Um grande volume de trabalhos científicos trata da biologia e genética do *T. cruzi*, porém todo esse conhecimento gerado não foi revertido em novas ferramentas terapêuticas. A falta de medicamentos para esta e outras doenças negligenciadas é o resultado tanto das insuficientes políticas públicas voltadas para produção e desenvolvimento de medicamentos, quanto da falha de mercado, provocada pelo baixo interesse econômico que esses pacientes representam para a indústria farmacêutica (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES *initiative*, 2009).

2.7 Aspectos Imunológicos

A ampla variação na evolução clínica da doença de Chagas é decorrente de uma complexa interação existente entre o parasito e o hospedeiro. Existem duas hipóteses principais que procuram explicar os mecanismos da patogênese da doença de Chagas humana. A primeira delas defende o papel central da persistência do parasita no hospedeiro como uma das principais causas de patologia, enquanto a outra postula que uma resposta imune contra antígenos próprios é responsável pelo dano tecidual observado nos órgãos afetados de indivíduos chagásicos (DUTRA; GOLLOB, 2008; KIERSZENBAUM, 2005).

Embora as teorias que procuram explicar os mecanismos subjacentes a patogênese da infecção chagásica sejam controversas, elas não são mutuamente exclusivas. Ambas devem ser, portanto, consideradas quando se tenta compreender o estabelecimento e manutenção da patologia da doença de Chagas. Independentemente da origem/fonte de antígenos que desencadeiam a resposta imune durante a infecção crônica, há um consenso de que o sistema imune do hospedeiro desempenha um papel central no desenvolvimento da patologia (DUTRA *et al.*, 2009).

As manifestações patológicas da doença de Chagas, tanto na forma CARD, como na forma DIG, estão associados com a ocorrência de uma reação inflamatória nos órgãos afetados, especialmente em locais onde antígenos de *T. cruzi* foram observados (FUENMAYOR *et al.*, 2005). A forma IND representa uma situação de "equilíbrio saudável"

entre o parasita e o hospedeiro, sendo a resposta imune induzida por estes indivíduos de caráter predominantemente antiinflamatório (DUTRA *et al.*, 2009).

Níveis elevados de TNF- α e IFN- γ são relacionados à evolução da doença e à gravidade da cardiopatia chagásica (PERÉZ-FUENTES *et al.*, 2003; TALVANI *et al.*, 2004), sugerindo a participação destas citocinas na formação da inflamação crônica e na lesão cardíaca. Resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro *et al.* (2008) ao estudarem o perfil de citocinas de chagásicos portadores da forma DIG. Neste mesmo trabalho, foram encontrados baixos níveis de IL-10 nestes pacientes. A IL-10 é uma citocina com importante propriedade antiinflamatória e imunossupressora. Alguns trabalhos demonstraram que a IL-10 é a citocina mais secretada por pacientes da forma IND (CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1999; CUNA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003). Os pacientes portadores da forma IND também apresentam níveis mais elevados de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), secretoras de IL-10 comparando-se aos níveis de pacientes CARD ou DIG (SILVEIRA *et al.*, 2009; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005).

Apesar de alguns trabalhos terem demonstrado o envolvimento da imunidade em todas as formas clínicas da infecção chagásica, ainda não foi estabelecido um padrão específico de resposta imune entre os pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (DUTRA *et al.*, 2005). A elucidação dos processos imunológicos é essencial não somente para melhorar o entendimento da sua imunopatogênese, como também os métodos de prevenção e terapêuticos, conduzindo a possíveis medidas que possam modificar a história natural da doença em benefício dos milhões de chagásicos existentes (DUTRA *et al.*, 2009).

2.8 Marcadores de prognóstico

Com o objetivo de diferenciar os pacientes chagásicos com potencial de evolução para as formas clínicas crônicas severas, grupos de pesquisa tentam estabelecer marcadores biológicos de evolução do prognóstico da doença através de mecanismos imunológicos (CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 1999; CUNHA-NETO *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 1993).

Alguns destes grupos de pesquisa buscam um padrão de imunoglobulinas associadas a um ou mais antígenos de *T. cruzi* que sejam capazes de diferenciar as formas clínicas e

predizer seu potencial evolutivo (CETRON *et al.*, 1993; CORDEIRO *et al.*, 2001; MICHAILOWSKY *et al.*, 2003; MORGAN *et al.*, 1996). Estudos realizados por Primavera *et al.* (1988; 1990) sugerem que a presença de anticorpo IgA específico para a forma amastigota do parasita está relacionada com o risco de progressão da doença para o desenvolvimento da forma DIG, em ambos pacientes portadores das formas IND e CARD. Zauza e Borges-Pereira (2001) monitoraram os títulos de IgG contra antígenos complexos do parasito de pacientes portadores da forma CARD durante 10 anos e concluíram que a progressão da cardiopatia chagásica possui correlação positiva com o aumento dos níveis de IgG.

No entanto, apesar de alguns estudos sugerirem a existência de uma relação entre o reconhecimento antígeno-específico e as formas clínicas da doença de Chagas e que a detecção de um isotipo particular de anticorpo sugere uma correlação com as manifestações clínicas desta enfermidade, poucos trabalhos foram realizados com antígenos puros de *T. cruzi* (MORGAN *et al.*, 1998).

2.9 Antígenos Recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*

Com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante nas últimas décadas, tornou-se possível a produção e purificação de proteínas específicas em larga escala, através de sua expressão em bactérias ou outros organismos. Através desta tecnologia, Lafaille *et al.* (1989) caracterizaram molecularmente dois genes de *T. cruzi* que codificam antígenos que apresentam uma estrutura de epítomos repetitivos. Em função de sua estrutura em epítomos repetitivos e sua localização, esses antígenos foram denominados CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen*) e FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*) (LAFAILLE *et al.*, 1989).

O antígeno CRA exibe uma estrutura de 14 aminoácidos que se repetem e se localiza no citoplasma das formas epimastigotas e amastigotas do *T. cruzi*. O outro antígeno, FRA, com uma estrutura de 68 aminoácidos que se repetem, é localizado na região do flagelo adjacente ao corpo das formas epimastigota e tripomastigota (LAFAILLE *et al.*, 1989).

Krieger *et al.* (1990) demonstraram que os genes que codificam estes antígenos são altamente polimórficos. Apesar de polimórficos em diferentes cepas, estes antígenos foram reconhecidos por mais de 95% dos soros chagásicos quando testados individualmente por radioimunoensaio, indicando que seus determinantes antigênicos são bem conservados

(GOLDENBERG *et al.*, 1991). Posteriormente estes antígenos foram testados em conjunto em um ELISA, onde se revelaram importantes para o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que suas sensibilidade e especificidade foram de 100% (KRIEGER *et al.*, 1992).

A partir dos estudos realizados com estes antígenos foi produzido um *kit* de diagnóstico sorológico para a infecção pelo *T. cruzi*, o EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos[®] que utiliza os antígenos recombinantes CRA e FRA em associação, produzidos através da tecnologia do DNA recombinante. Estudos sobre o desempenho diagnóstico do referido *kit* em população de área endêmica para doença de Chagas comprovou seu potencial diagnóstico, pois apresentou 100% de especificidade e sensibilidade (GOMES *et al.*, 2001).

Silva *et al.* (2002) também exploraram a capacidade do referido *kit* de diagnóstico em um estudo que avaliou a cura parasitológica após tratamento etiológico, e sugerem que o mesmo possa ser utilizado como triagem inicial para avaliar a cura de paciente chagásicos tratados etiologicamente. Gadelha *et al.* (2003) comparando os resultados do diagnóstico da infecção chagásica utilizando o EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos[®] com os obtidos por um ELISA convencional e um teste de HAI comumente usados em banco de sangue no Brasil, demonstraram que o ELISA recombinante pode ser seguramente usado na triagem sorológica para doença de Chagas.

A resposta imune frente aos antígenos CRA e FRA já foi estudada experimentalmente em camundongos. Pereira *et al.* (2003a) demonstraram que ambos os antígenos são capazes de gerar uma resposta imune humoral em camundongos após imunização. No entanto, a resposta imune gerada frente a estes antígenos não foi capaz de controlar a infecção pelo *T. cruzi*, embora tenha aumentado o tempo de sobrevivência dos animais desafiados (PEREIRA *et al.*, 2005). Uma resposta imune celular específica também foi gerada nos camundongos imunizados, induzindo uma resposta do tipo Th1 (PEREIRA *et al.*, 2003b), porém também sem capacidade de controlar a infecção, apesar de ter aumentado o tempo de sobrevivência dos camundongos (PEREIRA *et al.*, 2004).

Lorena *et al.* (2008) estudando a resposta imune celular de pacientes chagásicos crônicos frente aos antígenos CRA e FRA, avaliaram os níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 em sobrenadantes de culturas após estímulo *in vitro* com os antígenos. Os autores demonstraram que o antígeno CRA foi capaz de induzir uma resposta imune do tipo Th1, com elevada produção de TNF- α e IFN- γ , em pacientes chagásicos com as formas CARD e IND.

Verçosa *et al.* (2007) avaliando a resposta imune humoral de pacientes chagásicos crônicos diante dos antígenos CRA e FRA, estudaram o perfil isotípico de IgG e observaram que o isotipo IgG2 é capaz de diferenciar indivíduos chagásicos portadores da forma CARD daqueles portadores da forma IND quando se utiliza o antígeno recombinante FRA. Os autores sugerem que este isotipo poderá servir como um marcador de evolução clínica para forma CARD em indivíduos assintomáticos.

Apesar dos diversos estudos conduzidos com os antígenos CRA e FRA, apenas o trabalho de Verçosa *et al.* (2007) foi capaz de propor um marcador de prognóstico para as formas clínicas crônicas. Os resultados encontrados por estes autores indicam que a resposta imune humoral diante da utilização destes antígenos pode ser capaz de diferenciar pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas. Diante deste fato, mais estudos devem ser conduzidos avaliando-se a resposta imune humoral diante dos antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*, a fim de pesquisar a existência de novos candidatos a marcadores de progressão para as formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

3 JUSTIFICATIVA

Diante da magnitude da doença de Chagas, onde cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas na América Latina, de suas elevadas morbidade e mortalidade, além da ineficácia do tratamento etiológico, justificam-se estudos que visem à melhoria da qualidade de vida dos portadores desta enfermidade. Pouco ainda se conhece sobre os mecanismos imunes e patogênicos que estão envolvidos na transição da fase aguda para a crônica, bem como os fatores que favorecem o desenvolvimento de uma determinada forma clínica crônica. Sabe-se, no entanto, que a resposta de isotipos específicos tem sido associada às manifestações clínicas da doença de Chagas. Sendo assim, o presente trabalho se propôs a avaliar os níveis séricos de imunoglobulina A no soro de indivíduos chagásicos crônicos, frente a dois antígenos específicos do *Trypanosoma cruzi*, visando à obtenção de um possível marcador de evolução para discriminar as formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Qual a associação entre as diferentes formas clínicas crônicas da doença de Chagas e os níveis séricos de IgA frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*?

5 HIPÓTESE

A presença de níveis elevados de IgA frente aos antígenos recombinantes CRA ou FRA de *T. cruzi* pode ser capaz de diferenciar pacientes chagásicos portadores de diferentes formas clínicas.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação entre os níveis séricos de IgA de pacientes chagásicos crônicos frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

6.2 Objetivos Específicos

- Detectar os níveis de IgA presentes no soro de pacientes chagásicos crônicos, frente aos antígenos recombinantes CRA ou FRA de *T. cruzi*;
 - Associar os níveis séricos de IgA com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas (IND, CARD, DIG e MIS);
 - Determinar a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivo e negativo dos níveis séricos de IgA para avaliar a sua associação com as formas clínicas crônicas da doença de Chagas.
-
-

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

7.1 Desenho e população de estudo

O desenho de estudo deste trabalho foi do tipo caso-controle, onde foi definido como “caso” a presença de sintomatologia no trato gastrointestinal decorrente da infecção chagásica, condição presente nas formas clínicas DIG e MIS. Por outro lado, a ausência de sintomas digestivos específicos da doença de Chagas, situação presente nas formas IND e CARD, definiu o grupo considerado “controle”. O tamanho da amostra de indivíduos que foi selecionada para este estudo foi escolhido por conveniência, tendo em vista que este tipo de estudo é limitado por questões operacionais.

Noventa e seis pacientes chagásicos crônicos com as formas clínicas IND (n= 24), CARD (n=25), DIG (n=20) e MIS (n=27), e idade variando entre 23 e 77 anos (56 do sexo feminino e 40 do sexo masculino), foram selecionados, entre setembro de 2008 e setembro de 2009, no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE), situado na cidade de Recife, que atende indivíduos provenientes de todo o estado de Pernambuco.

O Ambulatório de Doença de Chagas do HUOC-UPE é considerado um centro de referência no atendimento do paciente portador da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. A filosofia de trabalho no ambulatório é dar atenção integral ao paciente, não só com ações de tratamento, mais também com o enfoque biopsicossocial. Atualmente existem cerca de 1.800 pacientes cadastrados, com uma média de 200 consultas por mês (OLIVEIRA JR., 2009).

Indivíduos não chagásicos, saudáveis (n=14), com idades entre 24 e 52 anos (12 do sexo feminino e 2 do sexo masculino), foram selecionados no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) da Fiocruz, situado na cidade de Recife, para estabelecimento do ponto de corte ou *cut-off* (CO) do ELISA. Todos os indivíduos saudáveis apresentam sorologia negativa para infecção pelo *T. cruzi*, em dois testes sorológicos de preparações antigênicas diferentes, nunca receberam transfusão de sangue e nem habitaram em área endêmica para doença de Chagas.

7.2 Avaliação dos pacientes

Na rotina do Ambulatório de Doença de Chagas do HUOC-UPE, os pacientes chagásicos são submetidos a exames clínico-laboratoriais para acompanhamento das manifestações clínicas decorrentes da infecção chagásica, que incluem exame físico, ecocardiograma, eletrocardiograma, raios X de tórax, raios X contrastado de esôfago e sorologia para *T. cruzi*. Foram incluídos neste estudo, somente pacientes chagásicos com dois testes sorológicos positivos, que apresentaram as formas clínicas bem definidas e que não receberam tratamento etiológico para a infecção pelo *T. cruzi*.

A interpretação dos exames de rotina e a conseqüente classificação dos pacientes nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas foram realizadas pela equipe médica do Ambulatório de Doença de Chagas do HUOC-UPE. Os critérios adotados para categorizar um paciente em determinada forma clínica, foram os mesmos descritos no Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (BRASIL, 2005)

Indivíduos que apresentaram sorologia positiva para a infecção pelo *T. cruzi*, sem manifestações clínico-laboratoriais de acometimento do coração ou trato digestivo, foram considerados como portadores da forma IND. As características epidemiológicas dos pacientes chagásicos com a forma IND que foram selecionados para participar deste estudo encontram-se presentes na tabela 1.

Tabela 1. Características epidemiológicas dos pacientes com a forma indeterminada

	Iniciais	Sexo	Idade	Naturalidade
1.	MNS	F	52	Belo Jardim
2.	EAA	F	65	Triunfo
3.	MJF	F	75	Nazaré da Mata
4.	JHM	F	52	Tupanatinga
5.	ZAO	M	47	Serra Talhada
6.	SMS	F	57	São Lourenço da Mata
7.	MJAB	F	54	São José da Laje - AL
8.	LMS	F	57	Monteiro
9.	APGS	M	37	Belo Jardim
10.	CAS	F	32	Recife
11.	ILS	M	58	Gamaleira
12.	NJS	M	58	Orobó
13.	MA	F	33	Sertânia
14.	JMS	M	IGN	Escada
15.	MJC	F	63	Buíque
16.	ASL	F	45	Caetés
17.	MLGN	F	59	Sertânia
18.	RMBS	F	IGN	Tabira
19.	CAS	M	63	Bom Jardim
20.	EFS	M	39	Vitória de Santo Antão
21.	MAS	M	30	Terra Nova
22.	MJLS	F	38	Arcoverde
23.	JCNS	M	23	Mirandiba
24.	OBS	M	45	Floresta

Nota: IGN – Informação ignorada; F = sexo feminino; M = sexo masculino

A presença de sorologia positiva para infecção chagásica, juntamente com sintomas de insuficiência cardíaca ou síncope, alterações eletrocardiográficas e/ou marcapasso, diminuição da função ventricular ou aneurisma apical no ecocardiograma e radiografia do tórax com aumento da área cardíaca em pacientes sem outra patologia cardíaca foram os critérios utilizados para categorizar um indivíduo como portador da forma CARD. Nenhum dos pacientes selecionados apresentou queixas de manifestações do trato digestivo. A tabela 2 indica as características epidemiológicas dos pacientes chagásicos com a forma CARD que participaram deste estudo.

Tabela 2. Características epidemiológicas dos pacientes com a forma cardíaca

	Iniciais	Sexo	Idade	Naturalidade
1.	JMS	M	69	Carpina
2.	AAN	F	58	Itapeti
3.	MNOL	F	61	Afogados da Ingazeira
4.	JIBF	M	59	Bom Jardim
5.	QSS	F	64	Belém de Maria
6.	RMC	F	77	Vicência
7.	MRBS	F	55	Bom Jardim
8.	AGS	M	52	Bom Jardim
9.	FSA	M	44	São Benedito do Sul
10.	RSA	M	30	Sertânia
11.	ADS	M	61	Nazaré da Mata
12.	OSS	M	63	São José do Egito
13.	MLV	F	55	Macaparana
14.	MJLR	F	60	Tabira
15.	TS	F	67	São José da Laje – AL
16.	GFS	M	54	Afogados da Ingazeira
17.	MCSS	F	69	Nazaré da Mata
18.	MJS	F	60	Paciência
19.	MJAB	F	55	São José da Laje – AL
20.	MPS	F	72	Itapeti
21.	JMF	M	62	Carpina
22.	MLAL	F	65	Limoeiro
23.	MDS	F	59	São Vicente Férrer
24.	MNFF	F	56	Pedra de Buíque
25.	MEC	F	58	Itambé

Nota: F = sexo feminino; M = sexo masculino

A forma DIG foi definida quando os indivíduos com sorologia positiva para doença de Chagas apresentavam alguma sintomatologia do trato digestivo característica, como disfagia e/ou constipação por mais de uma semana, com comprovação através de exame contrastado radiológico, de dilatação do esôfago ou cólon. Pacientes que realizaram cirurgia para correção de megaesôfago e/ou megacólon, e que não apresentaram alterações no coração, também foram incluídos como portadores da forma DIG. Como essa forma clínica pode apresentar alterações no esôfago e/ou cólon, na tabela 3 estão descritas as manifestações de cada paciente (MC – megacólon; ME – megaesôfago), além das características epidemiológicas dos pacientes chagásicos com a forma DIG selecionados para este estudo.

Tabela 3. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com a forma digestiva

	Iniciais	Sexo	Idade	Naturalidade	Manifestação Clínica
1.	MLLF	F	49	Buenos Aires	MC
2.	JBAB	M	42	Serrita	ME
3.	TMC	F	47	São Vicente Férrer	MC
4.	SMPL	F	48	Bom Jardim	ME
5.	SVS	F	43	Machado	ME
6.	DMS	M	54	Vicência	MC
7.	MLS	F	66	Bom Jardim	ME
8.	SNL	F	44	Buenos Aires	ME
9.	RFJ	F	62	Afogados da Ingazeira	ME
10.	GJS	M	51	Sertânia	ME
11.	MLS	F	59	Bom Jardim	ME
12.	SRSS	F	59	Paulista	ME
13.	MFBF	M	50	Caruaru	ME
14.	JLA	M	44	Vicência	MC
15.	LIS	F	40	IGN	ME
16.	EGS	F	65	IGN	ME
17.	RFF	F	75	Nazaré da Mata	ME
18.	MCS	F	49	Novolino – AL	ME
19.	MSS	M	69	Vitória de Santo Antão	ME
20.	SSS	F	69	São Vicente Férrer	MC e ME

Nota: IGN – Informação ignorada; F = sexo feminino; M = sexo masculino;
MC = megacólon; ME = megaesôfago

Os pacientes chagásicos, com sorologia positiva para o *T. cruzi*, que apresentaram, simultaneamente, as evidências de cardiopatia chagásica e megaesôfago e/ou megacólon, tratados cirurgicamente ou não, foram incluídos no grupo de pacientes portadores da forma MIS. Conforme utilizado na descrição clínico-epidemiológica dos pacientes com a forma DIG, a tabela 4 indica as características epidemiológicas e as manifestações (ME – megaesôfago; MC – megacólon) de cada paciente chagásico que foi selecionado para este estudo com a forma MIS.

Tabela 4. Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com a forma mista

	Iniciais	Sexo	Idade	Naturalidade	Manifestação Clínica
1.	SHS	M	44	Pandorama	MC
2.	BPN	F	55	Glória do Goitá	ME
3.	SMCS	F	47	Vicência	ME
4.	JCS	M	60	Timbaúba	ME
5.	SMR	F	39	Vicência	MC
6.	JPS	M	65	Bom Jardim	ME
7.	SMS	F	52	Sossego	ME
8.	VSS	M	55	União dos Palmares – AL	MC
9.	VAV	M	46	Macaparana	ME
10.	EZF	M	49	São José da Laje – AL	ME
11.	JPS	M	62	Bom Jardim	ME
12.	CZF	M	49	São José da Laje – AL	ME
13.	DSCS	F	45	Rio da Barra	ME
14.	JCS	M	65	Timbaúba	ME
15.	SEP	M	70	Carpina	MC
16.	JGS	M	52	Sertânia	MC
17.	MRS	F	47	Taperóa	ME
18.	ADS	M	60	Nazaré da Mata	ME
19.	MJL	F	69	Garanhuns	MC
20.	MLS	F	56	Timbaúba	ME
21.	JAS	M	51	Feira Nova	ME
22.	SJS	F	59	Carpina	MC
23.	MLXC	F	73	Nazaré da Mata	ME
24.	SRS	F	63	Nazaré da Mata	ME
25.	ARS	M	76	Panelas de Miranda	ME
26.	SPS	M	55	São Vicente Férrer	ME
27.	MJSA	F	65	Vicência	ME

Nota: F = sexo feminino; M = sexo masculino; MC = megacólon; ME = megaesôfago

7.3 Aspectos éticos

Os pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis selecionados para este estudo tiveram participação voluntária, e assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndices A e B), segundo a resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) 196/96. Os pacientes chagásicos também responderam a um questionário de pesquisa (Apêndice C), cujas informações foram coletadas diretamente com o indivíduo e a equipe médica complementou os dados do questionário com informações obtidas no prontuário do paciente. A conduta de inclusão dos mesmos e os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CPqAM, sob o parecer nº 070/2008 (Anexo A).

7.4 Obtenção das amostras

Os pacientes chagásicos e indivíduos sadios selecionados para este estudo tiveram 10ml de seu sangue coletados pelo sistema a vácuo, Vacutainer[®]. A coleta das amostras de sangue foi realizada no Ambulatório de Doença de Chagas do HUOC-UPE e no Ambulatório do CPqAM, seguindo as normas de biossegurança.

Os tubos de sangue coletados foram deixados à temperatura ambiente (TA) até sua completa coagulação e, posteriormente, foram centrifugados a 1500xg por 10min. O soro assim obtido foi separado em alíquotas e armazenado a -20°C até sua posterior utilização. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do CPqAM e incorporadas à soroteca do mesmo.

7.5 Diagnóstico etiológico confirmatório

Segundo o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (BRASIL, 2005), um indivíduo é considerado portador da doença de Chagas crônica quando apresenta dois testes sorológicos positivos para IgG de princípios metodológicos distintos ou com preparações antigênicas diferentes. Para a confirmação do diagnóstico etiológico dos pacientes chagásicos selecionados para este estudo foi utilizado o fluxograma descrito na figura 4.

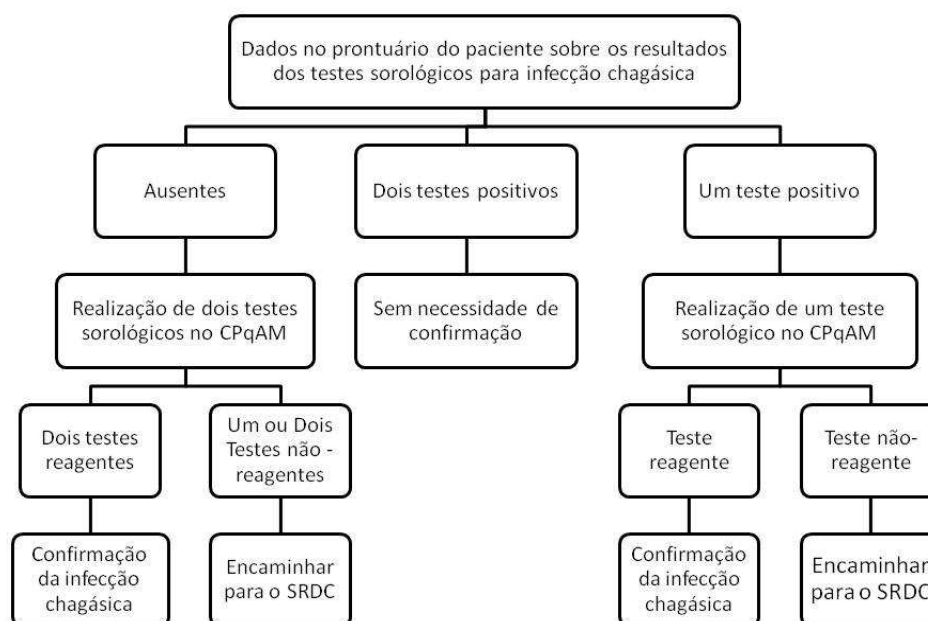


Figura 4. Fluxograma de confirmação do diagnóstico etiológico nos pacientes chagásicos
Nota: SRDC = Serviço de Referência em Doença de Chagas

Nos indivíduos saudáveis selecionados para este estudo foi necessária a realização dos dois testes sorológicos para confirmação da ausência da infecção pelo *T. cruzi*. Os testes sorológicos realizados neste estudo foram feitos através de dois kits de ELISA comerciais, de preparações antigênicas diferentes. Todos os 96 pacientes chagásicos selecionados para este estudo tiveram seu diagnóstico etiológico confirmado, sem necessidade de encaminhar amostras para o Serviço de Referência em Doença de Chagas (SRDC) do CPqAM. A ausência da infecção pelo *T. cruzi* foi confirmada em todos os indivíduos saudáveis previamente selecionados, sendo todos incluídos no estudo.

7.6 Antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*

Os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* foram produzidos no Laboratório de Reativos do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fiocruz como descrito por Krieger *et al.* (1992) e enviados para o Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM. Todos os lotes de antígenos utilizados neste estudo tiveram seus perfis protéicos analisados através de eletroforese em gel de poliácridamida na presença de dodecil sulfato de

sódio, seguida de coloração pela prata, para confirmar a ausência de contaminação por proteínas bacterianas, visto que os mesmos são produzidos em *Escherichia coli*.

7.7 Detecção de IgA frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA

Os níveis séricos de IgA frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA foram detectados através do método ELISA indireto no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do Departamento de Imunologia do CPqAM. Nesta técnica, a presença de anticorpos contra o parasita é revelada através de anticorpos anti-imunoglobulina ligados a uma enzima que, na presença do seu substrato, forma um produto colorido. No ELISA o resultado da reação é definido pela leitura da absorvância ou densidade óptica (DO) em espectrofotômetro, utilizando um filtro com comprimento de onda específico.

Placas de ELISA de 96 poços (Nunc-Immuno Plates, MaxiSorp, Nalge Nunc International Corporation, Rochester, NY) foram sensibilizadas (100µL/poço) com os antígenos recombinantes CRA ou FRA em uma concentração previamente definida (0,625 µg/ml), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6 e incubadas *overnight* a 4°C. Após uma série de três lavagens com 200µL/poço de tampão salina-fosfato 0,157M (*Phosphate-buffered saline* – PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA, St. Louis, MO) (PBS-Tween), foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 200µL/poço de PBS-Tween contendo 1,0% de albumina bovina sérica (*Bovine serum albumin* - BSA) (SIGMA, St. Louis, MO) por 4hs à TA. Em seguida, uma nova etapa de lavagem foi realizada e, posteriormente, os soros diluídos (1:100) em PBS-Tween foram depositados em duplicata nos poços (100µL/poço) e incubados *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas como descrito anteriormente e a ligação do isotipo IgA foi detectada pela incubação por 1h30min à TA de 100µL/poço do anticorpo anti-IgA conjugado à biotina (SIGMA, St. Louis, MO), diluído (1:4000) em PBS-Tween contendo 0,1% de BSA. Após nova lavagem, as placas foram incubadas por 1h à TA com 100µL/poço de estreptavidina conjugada à peroxidase (Pharmingen, San Jose, CA), diluída (1:3000) em PBS-Tween. Após mais uma etapa de lavagem, a reação foi revelada pela adição de 100µL/poço de ortofenilenodiamina (0,01%) (SIGMA, St. Louis, MO) e peróxido de hidrogênio (0,01%) (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), diluídos em tampão citrato-fosfato 0,077M, pH 5,0. A reação foi bloqueada pela adição de

100µL/poço de ácido sulfúrico 2,5M (VETEC, Rio de Janeiro, RJ). A quantificação da reação foi determinada através do leitor de ELISA (BIO-RAD 3550, Bio-Rad Laboratories, Vienna, VA) a 490 nm.

O *cut-off* (CO) foi estabelecido para cada placa calculando-se a média das DOs dos indivíduos saudáveis, adicionada de dois desvios-padrão. Os resultados foram expressos na forma de índices de reatividade, onde os valores das médias das DOs das amostras foram divididas pelo CO de sua respectiva placa, a fim de tornar comparáveis os resultados das diferentes placas (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2003).

7.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no Laboratório de Métodos Quantitativos do Departamento de Saúde Coletiva (NESC) do CPqAM, utilizando-se o *software* R (*The R Project for Statistical Computing, R Development Core Team*) para análise dos resultados. Os testes de Bartlett, ANOVA e Tukey foram utilizados para avaliar as diferenças entre os índices de reatividade calculados para cada amostra. A diferença entre os resultados obtidos foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Para avaliar o desempenho do ELISA na detecção dos níveis séricos da IgA frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA, os parâmetros de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo foram determinados, segundo descrito por Ferreira e Ávila (2001). Resultados positivos para este marcador foram considerados quando os pacientes apresentaram seus índices de reatividade superiores a 1.0, o que indica que este isotipo foi maior do que o CO de sua respectiva placa. Os parâmetros diagnósticos avaliados foram calculados, com seus respectivos intervalos de confiança (IC), com grau de confiança 95%, no *software* Epi-Info 6.04 (*Centers for Disease Control and Prevention, USA*).

Os gráficos e tabelas foram construídos utilizando-se os programas *Graphpad Prism* e *Microsoft Excel*, respectivamente.

8 RESULTADOS

8.1 Análise do isotipo IgA frente ao antígeno CRA

De uma maneira geral, ao analisar os índices de reatividades para IgA, frente ao antígeno CRA, verificou-se que este isotipo foi detectado em todos pacientes chagásicos crônicos estudados. No entanto, níveis variados deste isotipo foram observados nas diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas.

Pacientes chagásicos com alterações digestivas puderam ser diferenciados dos demais pacientes, com a avaliação deste isotipo, visto que seus índices de reatividade foram significativamente maiores (Figura 5). Os pacientes com a forma DIG apresentaram os maiores índices de reatividade, sendo capazes de diferenciá-los dos pacientes com as formas IND e CARD ($p < 0,0001$). Os indivíduos com a forma MIS da doença de Chagas também apresentaram níveis séricos elevados de IgA frente ao antígeno CRA, capazes de distingui-los daqueles portadores das formas IND ($p = 0,0013$) e CARD ($p = 0,0001$).

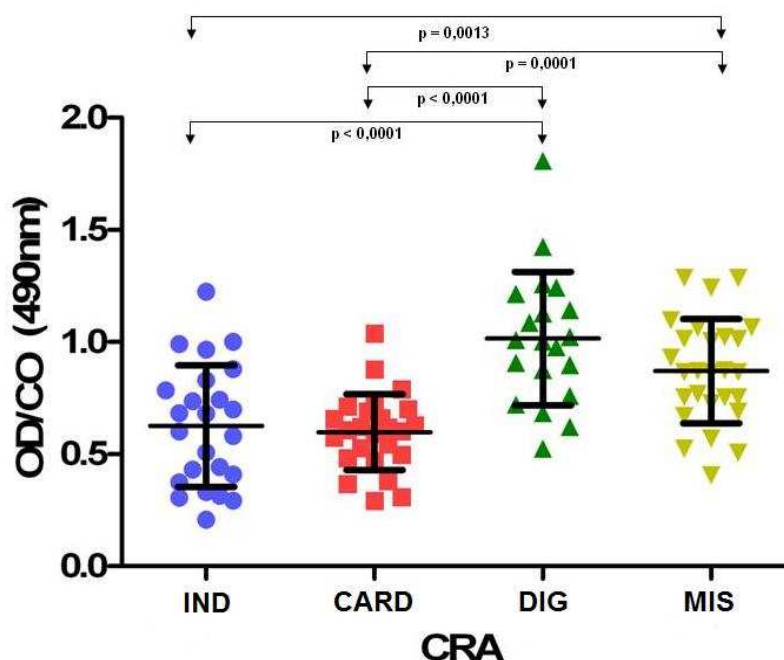


Figura 5. Índices de reatividade de IgA, frente ao antígeno recombinante CRA de *T. cruzi*, em pacientes chagásicos crônicos.

Nota: Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra, resultante da divisão da média da densidade óptica (OD) pelo *cut-off* (CO) da respectiva placa. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Estão destacados os valores de p que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). CRA = Antígeno Repetitivo Citoplasmático; IND = forma indeterminada; CARD = forma cardíaca; DIG = forma digestiva; MIS = forma mista.

8.2 Análise do isotipo IgA frente ao antígeno FRA

Avaliando a resposta imune humoral gerada pelos pacientes chagásicos crônicos diante da utilização do antígeno FRA, também foi possível verificar que o isotipo IgA foi produzido, com níveis variados de reatividade, nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Os indivíduos com a forma DIG apresentaram índices de reatividade de IgA frente ao antígeno FRA maiores do que os dos pacientes com as formas IND ($p=0,0031$) e CARD ($p=0,0078$). O mesmo resultado foi observado nos pacientes com a forma MIS que apresentaram níveis séricos elevados deste isotipo, capazes de diferenciá-los dos portadores das formas IND ($p=0,0001$) e CARD ($p=0,0003$). Portanto, também houve diferenciação dos pacientes chagásicos com manifestações digestivas da doença daqueles que não apresentam alterações digestivas, através da presença de IgA frente ao antígeno FRA, visto que seus índices de reatividade foram significativamente maiores (Figura 6).

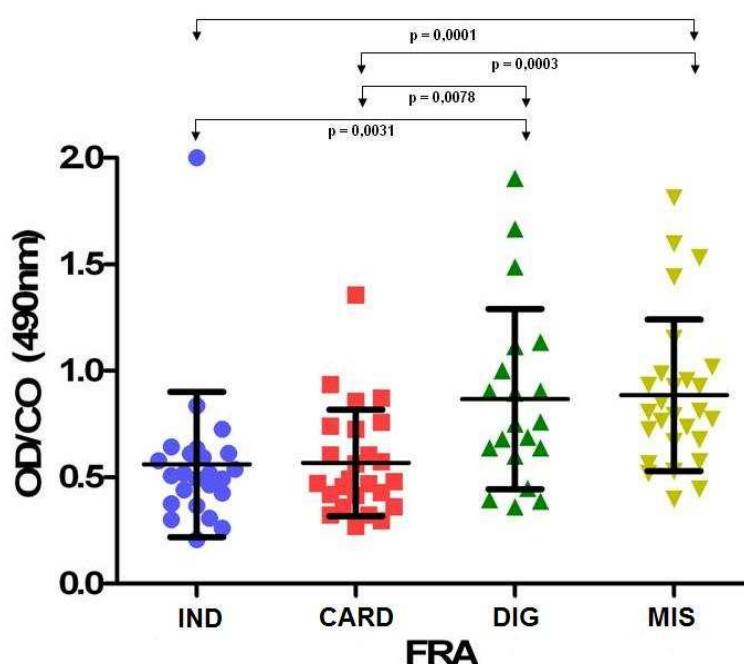


Figura 6. Índices de reatividade de IgA, frente ao antígeno recombinante FRA de *T. cruzi*, em pacientes chagásicos crônicos.

Nota: Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra, resultante da divisão da média da densidade óptica (OD) pelo *cut-off* (CO) da respectiva placa. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Estão destacados os valores de p que apresentaram diferença significativa ($p<0,05$). FRA = Antígeno Repetitivo Flagelar; IND = forma indeterminada; CARD = forma cardíaca; DIG = forma digestiva; MIS = forma mista.

8.3 Desempenho do ELISA para detecção de IgA frente aos antígenos CRA e FRA

A partir dos resultados obtidos nas seções anteriores, foi possível selecionar os dois antígenos recombinantes do *T. cruzi*, para avaliar o desempenho do isotipo IgA na diferenciação de pacientes chagásicos portadores de diferentes formas clínicas. De acordo a análise dos índices de reatividade, o teste de IgA frente aos antígenos CRA e FRA foi avaliado quanto ao seu potencial de discriminar a presença de manifestações digestivas decorrentes da infecção chagásica.

Para estabelecimento do critério doença foram utilizados os parâmetros clínicos convencionais, que incluem o achado radiológico de dilatação do esôfago e/ou cólon. Portanto, os pacientes chagásicos portadores das formas DIG e MIS foram incluídos como casos. A ausência de acometimento digestivo radiologicamente comprovado foi o critério utilizado para estabelecer os indivíduos que seriam considerados controles. Neste grupo foram incluídos os pacientes portadores das formas IND e CARD da doença de Chagas.

A tabela 5 indica os valores percentuais de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, com seus respectivos intervalos de confiança, para o teste de presença de IgA frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* em amostras de soro de pacientes chagásicos com dano digestivo decorrente da doença.

Tabela 5. Desempenho do ELISA para detecção de IgA frente aos antígenos recombinantes CRA ou FRA de *T. cruzi* em amostras de soro de pacientes chagásicos com dano digestivo

	CRA	IC (95%)	FRA	IC (95%)
Sensibilidade	44,7	30,5 – 59,8	25,5	14,4 – 40,6
Especificidade	93,9	82,1 – 98,4	95,9	84,9 – 99,3
Valor Preditivo Positivo	87,5	66,5 – 96,7	85,7	56,2 – 97,5
Valor Preditivo Negativo	63,9	51,7 – 74,6	57,3	45,9 – 68,0

Nota: IC = Intervalo de Confiança; CRA = Antígeno Repetitivo Citoplasmático; FRA = Antígeno Repetitivo Flagelar

9 DISCUSSÃO

A doença de Chagas apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas. Em sua fase crônica os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* variam desde pacientes assintomáticos até pacientes com severas complicações cardíacas e/ou digestivas (BRASIL, 2005). O polimorfismo clínico da infecção chagásica ainda desperta o interesse de alguns grupos de pesquisa, visto que os mecanismos patológicos que culminam com o estabelecimento das lesões crônicas ainda carecem de melhores explicações (DUTRA *et al.*, 2005).

A classificação atual das formas clínicas IND, CARD, DIG e MIS é realizada principalmente através do eletrocardiograma, e das radiografias de tórax e abdômen, partindo da anamnese do paciente. A investigação de alterações precoces do sistema cardíaco ou digestivo, através desta avaliação convencional, é inadequada, porque ela apenas revela a atual situação clínica do paciente (OLIVEIRA JR., 1996). Algumas técnicas e testes prognósticos mais sensíveis vêm sendo estudadas para detectar e acompanhar o desenvolvimento de alterações cardíacas em indivíduos com a forma IND (ABEL *et al.*, 2001; BARROS-MAZON *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2005). No entanto, um pequeno número de estudos vem sendo conduzido para detectar alterações precoces no trato gastrointestinal.

Sá Ferreira *et al.* (1983), estudando os níveis séricos de IgA total em pacientes com doença de Chagas crônica, observaram que em 50% dos indivíduos com a forma DIG, a IgA encontrava-se significativamente elevada. Os níveis séricos de IgA mais elevados foram vistos nos pacientes com maior grau de envolvimento do sistema digestivo. Os autores sugeriram que este fato foi observado devido à presença de anticorpos anti-*T. cruzi* deste isotipo de imunoglobulina.

Esta hipótese foi confirmada através de um estudo conduzido por Primavera *et al.* (1988). Através do uso de um teste de imunofluorescência para detectar anticorpos do isotipo IgA no soro de pacientes chagásicos, os autores avaliaram a presença deste isotipo contra antígenos brutos das três diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* (amastigota, epimastigota e tripomastigota). Eles observaram que pacientes com manifestações digestivas da doença (portadores de ambas as formas DIG e MIS) apresentaram níveis significativamente mais elevados de IgA contra antígenos da forma amastigota, quando comparados com pacientes com outras formas clínicas. No mesmo estudo, nenhuma diferença foi observada nos títulos

de IgA contra antígenos das formas epimastigota e tripomastigota entre os pacientes com diferentes formas clínicas.

Posteriormente, Primavera *et al.* (1990) avaliaram novamente a presença de IgA contra antígenos das três formas evolutivas do *T. cruzi*. Desta vez, a análise incluiu um número maior de indivíduos chagásicos e foi realizada a avaliação do desempenho do teste na diferenciação de pacientes com as formas crônicas com dilatação do trato gastrointestinal. O teste de IgA contra antígenos da forma amastigota apresentou sensibilidade e especificidade significativas, quando comparadas com o teste contra antígenos das formas tripomastigota e epimastigota.

Os níveis de IgA contra antígenos da forma epimastigota foram avaliados por Morgan *et al.* (1996) através de um ELISA. Níveis mais elevados deste isotipo foram observados nos soros de pacientes com a forma DIG, quando comparados com indivíduos portadores de qualquer outra forma clínica. Curiosamente, pacientes com a forma MIS não expressaram altos níveis séricos de IgA. Ao analisar a reatividade IgA em pacientes chagásicos crônicos através de Western Blot com preparações antigênicas solúveis de *T. cruzi*, os mesmos autores não conseguiram demonstrar nenhum perfil de ligação de IgA a antígenos do *T. cruzi*, mesmo avaliando o soro de pacientes com diferentes estados clínicos da infecção chagásica (MORGAN *et al.*, 1998).

A diversidade de resultados encontrados na avaliação da resposta imune humoral de pacientes chagásicos crônicos com acometimento digestivo se deve, provavelmente, a utilização de antígenos brutos de *T. cruzi* que podem apresentar variações antigênicas por serem obtidos de diferentes cepas ou pela própria maneira de obtenção e purificação dos mesmos (LORCA *et al.*, 1992).

No presente estudo, ao avaliarmos a resposta imune humoral gerada pelos pacientes chagásicos crônicos, utilizando os antígenos recombinantes CRA e FRA do *T. cruzi*, encontramos níveis elevados de IgA nos pacientes com as formas DIG e MIS, para ambos os antígenos recombinantes utilizados. Tanto o CRA, como o FRA são expressos na forma epimastigota do *T. cruzi*, porém o CRA é expresso em amastigotas, enquanto o FRA é expresso em tripomastigotas (LAFAILLE *et al.*, 1989).

O aumento dos níveis de IgA contra o antígeno CRA em pacientes chagásicos crônicos com danos digestivos encontrados neste estudo, corroboram os estudos de Primavera *et al.* (1988; 1990) que observaram maiores níveis deste isotipo de imunoglobulina contra antígenos de amastigota neste mesmo grupo de indivíduos. No entanto, em nosso estudo,

interessantemente, o antígeno FRA também foi capaz de distinguir os pacientes portadores das formas DIG e MIS daqueles que não têm manifestações clínicas de envolvimento do trato digestivo. Vale ressaltar que, até o presente momento, pelo descrito na literatura, antígenos presentes na forma tripomastigota não haviam sido capazes de diferenciar pacientes chagásicos com as formas DIG e MIS através da presença de IgA sérica.

O uso de antígenos puros e molecularmente definidos pode ser uma excelente estratégia para elucidar os fatores imunológicos que desenvolvem e mantêm as formas clínicas crônicas da doença de Chagas (LORCA *et al.*, 1992). Ambos os antígenos recombinantes utilizados neste estudo, CRA e FRA, são quimicamente caracterizados e apresentam uma estrutura epítomos repetitivos. O antígeno CRA que é distribuído por todo o citoplasma do parasita tem uma repetição de 14 aminoácidos, enquanto o antígeno FRA que está localizado no flagelo apresenta uma repetição de 68 aminoácidos (LAFAILLE *et al.*, 1989). Nossos resultados demonstraram que a utilização de antígenos com essas características podem revelar uma resposta imune isotipo específica que não é observada com antígenos brutos.

Sabe-se que todas as formas evolutivas do *T. cruzi* têm a capacidade de gerar tanto resposta imune humoral, como celular, que juntas, contribuem para o aparecimento das manifestações clínicas presentes na doença de Chagas. Tem sido demonstrado que as imunoglobulinas apresentam um importante papel na infecção chagásica, tanto na fase aguda, onde são gerados anticorpos, principalmente para os antígenos de superfície do *T. cruzi*, como na fase crônica, onde há uma produção diversificada de imunoglobulinas, sendo estas geralmente específicas para antígenos internos do parasita (UMEZAWA *et al.*, 1996).

No entanto, apesar da ocorrência de níveis elevados do isotipo IgA na formas crônicas com acometimento digestivo da doença de Chagas ter sido evidenciada previamente por alguns autores, e também neste estudo, ainda não foi completamente esclarecido como estes anticorpos anti-*T. cruzi* estão sendo continuamente produzidos. De acordo com a sua localização, na interface entre o próprio corpo e o ambiente externo, e sua anatomia, o trato gastrointestinal manifesta algumas características que distingue o sistema imune das mucosas, em relação ao sistema imune sistêmico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004a).

O trato gastrointestinal apresenta, em toda a sua extensão, nódulos linfóides na lâmina própria da camada mucosa e na camada submucosa que constituem o tecido linfóide associado às mucosas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004b). Estes nódulos linfóides são constituídos por uma quantidade elevada de linfócitos B, produtores de IgA. Apresentam

também um número razoável de linfócitos T CD4⁺, e em pequena quantidade, linfócitos T CD8⁺ e macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Acredita-se que, nas mucosas, está concentrada a maior parte das células produtoras de anticorpos num organismo normal (60% de todos os plasmócitos em humanos). Essa massa de linfócitos B produz em humanos, aproximadamente, um total de 66mg de IgA secretória por kg de peso ao dia, quase o dobro da produção de IgG sérica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004b).

A reatividade a antígenos do *T. cruzi* presentes na mucosa é dependente da apresentação de antígenos via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) de classe II aos linfócitos T CD4⁺ por macrófagos ou por linfócitos B (MAYER, 1998). Alguns autores sugerem que macrófagos na doença de Chagas não têm, preferencialmente, função de célula apresentadora de antígeno (*Antigen-Presenting Cell* - APC) (VIRREIRA *et al.*, 2006). Esta observação levou Molica (2007), em sua dissertação de mestrado, a avaliar a hipótese de que na doença de Chagas, a função de APC seja exercida, preferencialmente, por linfócitos B, visto que os mesmos estão presentes em elevadas concentrações.

Para compreender melhor o envolvimento dos linfócitos B como APC, a autora avaliou a expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 em linfócitos B CD19⁺ em culturas de células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* - PBMC) de pacientes chagásicos, após estimulação *in vitro* com antígenos da forma epimastigota. A observação de uma maior expressão das moléculas HLA-DR e CD80 em linfócitos B CD19⁺, aliada a análise de monócitos/macrófagos ativados, fez com que a autora sugerisse que linfócitos B têm sua função de APC regulada por macrófagos frente estimulação antigênica pelo *T. cruzi* (MOLICA, 2007).

Lemos *et al.* (1998) estudando pacientes que apresentavam a forma DIG da doença de Chagas, realizaram análise do sangue destes indivíduos com o objetivo de verificar o fenótipo dos linfócitos circulantes. Foi observada uma diminuição significativa do número de linfócitos T CD4⁺ e de linfócitos B CD19⁺ em indivíduos portadores de megaesôfago avançado. Uma possibilidade postulada pelos autores para explicar a razão desta diminuição é o recrutamento destas células induzido pelo *T. cruzi* para o local da lesão, pois os mesmos resultados não haviam sido observados em pacientes chagásicos cardiopatas (DUTRA *et al.*, 1994). Esta hipótese foi corroborada posteriormente, com a demonstração de um predomínio de linfócitos T CD4⁺ e de linfócitos B em lesões do trato gastrointestinal, em contraste com um predomínio de linfócitos T CD8⁺ nas lesões no coração (DUTRA *et al.*, 2009).

Alguns autores já demonstraram que, nas mucosas, a resposta de linfócitos Th2, predomina sobre a resposta de linfócitos Th1 (XU-AMANO *et al.*, 1992). Portanto, os linfócitos T *helper* ativados do subtipo Th2 após estimulação antigênica, produziram as citocinas TGF- β e IL-5, que são indutoras da proliferação e diferenciação dos linfócitos B em células plasmáticas, secretoras de IgA (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; KIYONO *et al.*, 1984).

A IgA secretada tem uma importante função efetora na imunidade do sistema digestivo, se ligando a antígenos presentes na mucosa e no lúmen do trato gastrointestinal, neutralizando-os. Além da neutralização, este isotipo também é capaz de induzir a fagocitose através da opsonização de patógenos e ativar a via clássica do complemento (LAMM, 1998).

Considerando os níveis elevados de IgA contra antígenos do *T. cruzi* em pacientes chagásicos com acometimento digestivo encontrados neste estudo e em anteriores, pode-se sugerir que, na mucosa do trato gastrointestinal destes pacientes, existe a presença de antígenos que estão continuamente estimulando a produção de IgA por linfócitos B, sendo esta estimulação, dependente de linfócitos T CD4⁺.

A comprovação desta hipótese foi demonstrada por alguns autores ao avaliarem a presença de DNA de *T. cruzi* no tecido esofágico ou do cólon de pacientes chagásicos com a forma DIG (MANOEL-CAETANO *et al.*, 2008; MANOEL-CAETANO *et al.*, 2009; VAGO *et al.*, 1996; VAGO *et al.*, 2000). Nestes estudos não foram encontradas evidências da presença do *T. cruzi* no trato gastrointestinal de pacientes com a forma IND ou CARD.

Apesar das fortes evidências da persistência parasitária nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas, reforçada pelo aparecimento de parasitemia em indivíduos co-infectados pelo HIV (SARTORI *et al.*, 2007), outros autores sugerem a hipótese de autoimunidade nas formas crônicas sintomáticas da infecção chagásica.

A patologia da forma DIG é causada principalmente por uma reação inflamatória localizada no plexo nervoso mioentérico, com conseqüente destruição progressiva do mesmo, que gera problemas de motilidade e dilatação, responsáveis pelo aparecimento dos sintomas de disfagia e constipação (VASCONCELLOS, 1996). Al-Sabbagah *et al.* (1998) demonstraram a similaridade antigênica de proteínas presentes no flagelo do *T. cruzi* com a proteína básica da mielina. Em estudo recente, conduzido por Oliveira *et al.* (2009), os autores demonstraram a presença de anticorpos anti-mielina em pacientes chagásicos com a forma DIG, o que não foi observado em pacientes com a forma IND, nem com a forma CARD. Estes achados reforçam a hipótese da autoimunidade na forma DIG da doença de

Chagas e poderiam explicar os níveis séricos elevados de IgA contra o antígeno FRA nas formas DIG e MIS, encontrados neste estudo.

As duas hipóteses levantadas para explicar a imunopatogênese das alterações digestivas da doença de Chagas, apesar de diferentes, não se excluem mutuamente. Muitos estudos ainda deverão ser conduzidos para se definir se alguma delas ou ambas estão corretas (DUTRA *et al.*, 2009). No entanto, independentemente da hipótese escolhida, é evidente que a presença de antígenos no tecido da mucosa do trato gastrointestinal de pacientes chagásicos com alterações digestivas estão estimulando a produção específica de IgA por linfócitos B. Portanto, a presença deste isotipo específico para antígenos de *T. cruzi* pode ser utilizada como um possível marcador de evolução para as formas DIG e MIS.

A análise do desempenho da IgA contra os antígenos recombinantes CRA ou FRA na diferenciação dos pacientes chagásicos com alterações digestivas, mostrou que este teste tem uma especificidade e um valor preditivo positivo muito bons. A baixa sensibilidade e o baixo valor preditivo negativo, observados neste estudo, podem ter sido encontrados devido ao critério utilizado para diagnóstico de envolvimento do trato gastrointestinal nos pacientes chagásicos, que inclui a presença de dilatação do esôfago e/ou cólon, o que atualmente é limitado pelos procedimentos radiológicos. Nosso candidato a marcador imunológico de prognóstico, provavelmente poderá detectar fases iniciais deste envolvimento em indivíduos com as formas IND e CARD.

Em um estudo de acompanhamento (prospectivo), nos pacientes com as formas IND e CARD analisados neste estudo, a confirmação do desenvolvimento de insuficiência do sistema digestivo com elevação dos níveis séricos de IgA contra os antígenos CRA e FRA de *T. cruzi* poderá prever a utilização deste teste como uma alternativa valiosa para o prognóstico das formas DIG e MIS da doença de Chagas. A investigação de alterações precoces no sistema digestivo com marcadores séricos pode ser uma boa maneira de ajudar os médicos no acompanhamento e no redirecionamento das condutas terapêuticas de pacientes chagásicos portadores das formas IND e CARD, com potencial de progressão para estas formas crônicas da doença de Chagas que cursam com distúrbios digestivos.

10 CONCLUSÕES

1. Pacientes chagásicos com as formas DIG e MIS apresentam níveis elevados de IgA, demonstrados pelo altos índices de reatividade para IgA contra os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*. Através deste isotipo foi possível diferenciá-los dos pacientes com as formas IND e CARD, o que sugere sua utilização como marcador de evolução clínica das alterações digestivas decorrentes da infecção chagásica, após confirmação desta hipótese em um estudo prospectivo.
 2. Através dos níveis séricos de IgA contra os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*, avaliados pelos índices de reatividade, não é possível fazer diferenciação entre os pacientes chagásicos portadores das formas DIG e MIS ou entre os portadores das formas IND e CARD. Portanto, este isotipo não pode ser utilizado como marcador para diferenciar essas formas clínicas crônicas da doença de Chagas.
 3. O desempenho do ELISA para detecção de IgA frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* revela que este marcador imunológico é bastante específico e que seu aparecimento no soro tem associação com as manifestações digestivas da infecção chagásica. Logo, a presença de anticorpos do isotipo IgA contra os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* é um candidato a marcador das formas DIG e MIS da doença de Chagas.
-
-

11 PERSPECTIVAS

1. Avaliar a presença de IgA contra os antígenos CRA e FRA de *T. cruzi* em pacientes chagásicos portadores das formas DIG e MIS, com graus variáveis de dano digestivo (diferentes graus de dilatação do esôfago e/ou cólon) para correlacionar com os níveis séricos deste marcador.
 2. Realizar um estudo prospectivo para avaliar se os indivíduos portadores das formas IND e CARD analisados no presente estudo, caso evoluam para as formas DIG e MIS, respectivamente, apresentarão o marcador IgA contra os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi*.
 3. Analisar os níveis séricos de IgA contra os antígenos recombinantes CRA e FRA de *T. cruzi* em pacientes chagásicos com diferentes formas clínicas, provenientes de outras áreas endêmicas para doença de Chagas, como Bahia, Goiás e Minas Gerais.
-
-

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Cells and tissues of the immune system. In: _____. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 17-38.

ABEL, L. C. J. *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, London, v. 17, p. 99-108, 2001.

AL-SABBAGH, A. *et al.* Evidence for cross-reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein in experimental Chagas disease. **Experimental Parasitology**, New York, v. 89, p. 304-311, 1998.

ANDRADE, Z. A. Patologia e Patogenia. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. p. 27-38.

BARROS-MAZON S. *et al.* Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 111, p. 137-145, 2004.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, Suppl. 3, p. 1-29, 2005.

BRITTO, C. C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl 1, p. 122-135, 2009.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico. In: CANÇADO, J. R.; CHUSTER, M. (Org.). **Cardiopatia Chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, 1985. p. 327-355.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Trypanosomiasis, American**. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>> Acesso em: 05 jan 2009.

CERBAN, F. M. *et al.* Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acid antigens in patients with different degrees of heat damage. **Clinical Immunology and Immunopathology**, Orlando, v. 67, n. 1, p. 25-30, 1993.

CETRON, M. S. *et al.* Humoral and cellular immune response of adults from Northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: depressed cellular immune response to *T. cruzi* antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 49, n. 3, p. 370-382, 1993.

CORDEIRO, F. D. *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin IgG1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, n. 1, p. 112-118, 2001.

CORRÊA-OLIVEIRA, R. *et al.* The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, Suppl. 1, p. 253-255, 1999.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 10 years after its Discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl 1, p. 31-40, 2009.

CUNA, W. R. *et al.* Interferon- γ or IL-10 production is induced by related *Trypanosoma cruzi* antigens. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 2, p. 295-299, 2000.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 133-137, 1998.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 147-156, 1999.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 2020-2021, 2006.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, Suppl 1, p. 13-22, 2007.

DIAS, J. C. P. *et al.* Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 193-196, 2008.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES *initiative*. **Doenças Negligenciadas**. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx> Acesso em: 24 ago 2009.

DUTRA, W. O. *et al.* Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. **International Immunology**, Oxford, v. 6, p. 499-506, 1994.

DUTRA, W. O. *et al.* The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 581-587, 2005.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 21, p. 287-292, 2008.

DUTRA, W. O. *et al.* Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl 1, p. 208-218, 2009

FERREIRA, A. W.; ÁVILA S. L. M. Sorologia: Importância e Parâmetros. In: _____. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1-8.

FUENMAYOR, C. *et al.* Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. **Acta Cardiologica**, Bruxelas, v. 60, p.33-67, 2005.

GADELHA, A. A. M. *et al.* Chagas' disease Diagnosis: Comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and hemagglutination tests. **Vox Sanguinis**, Oxford, v. 85, n. 3, p. 165-170, 2003.

GARCIA, S. *et al.* Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 4, p. 1521-1528, 2005.

GOLDENBERG, S. *et al.* Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 71-76, 1991.

GOMES, Y. M. Diagnóstico Etiológico. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. p. 119-132.

GOMES, Y. M. PCR and sero-diagnosis in chronic Chagas' disease: biotechnological advances. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 66, p. 107-119, 1997.

GOMES, Y. M. *et al.* Serodiagnosis of chronic Chagas' disease by using EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 4, p. 497-501, 2001.

GOMES, J. A. S. *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.

GOMES, J. A. S. *et al.* Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, p. 7960-7966, 2005.

HOTEZ, P. J. *et al.* Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. O Trato Digestivo. In: _____. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004a. p. 284-316.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Sistema Imunitário e Órgãos Linfáticos. In: _____. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004b. p. 254-283.

JUNQUEIRA JUNIOR, L. F. Ecos da XXII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e X Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 6, p. 565-566, 2006.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 11, p. 513-516, 2005.

KRIEGER, M. A. *et al.* Expression and polymorphism of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen. **Experimental Parasitology**, New York, v. 70, n. 3, p. 247-254, 1990.

KRIEGER, M. A. *et al.* Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 4, p. 427-434, 1992.

KROPF, S. A. *et al.* Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 347-365, 2000.

KIYONO, H. *et al.* Isotype-specificity of helper T-cell clones: Peyer's patch Th cells preferentially collaborate with mature IgA B cells for IgA responses. **Journal Experimental Medicine**, New York, v. 159, p. 798-805, 1984.

LAFAILLE, J. J. *et al.* Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 127-136, 1989.

LAMM, M. E. Current Concepts in Mucosal Immunity IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 274, p. 614-617, 1998.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. (Org.). **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 73-100.

LEMOS, E. M. *et al.* Decreased CD4+ Circulating T Lymphocytes in Patients with Gastrointestinal Chagas Disease. **Clinical Immunology and Immunopathology**, Orlando, v. 88, n. 2, p. 150-155, 1998.

LIEKE, T. *et al.* Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 145, n. 2, p. 357-364, 2006.

LORCA, M. *et al.* Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic Chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 44-49, 1992.

LORENA, V. M. B. *et al.* Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 22, p. 91-98, 2008.

MANOEL-CAETANO, F. S. *et al.* kDNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* in blood and esophageal mucosa from chronic chagasic patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, p. 1102-1107, 2008.

MANOEL-CAETANO, F. S. *et al.* Gene mutations in esophageal mucosa of Chagas disease patients. **Anticancer Research**, Athens, v. 29, p. 1243—1248, 2009.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl 1, p. 319-324, 2009.

MAYER, L. Current Concepts in Mucosal Immunity I. Antigen presentation in the intestine: new rules and regulations. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 274, p. 7-9, 1998.

MICHAILOWSKY, V. *et al.* Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived Paraflagellar Rod Proteins in patients with Chagas' disease. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 6, p. 3165-3171, 2003.

MOLICA, A. M. **Associação entre apresentação de antígeno, imunorregulação e morbidade na doença de Chagas**. 2007. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

MOREL, C. M.; LAZDINS, J. Focus: Chagas disease. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 1, p. 14-15, 2003.

MORGAN, J. *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 355-359, 1996.

MORGAN, J. *et al.* Analysis of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype specificities by Western blot in sera from patients with different forms of Chagas' disease. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 84, n. 3, p. 641-643, 1998.

MOTRAN, C. C. *et al.* Antibody isotypes profiles against *Trypanosoma cruzi* antigens in two Ameridian populations from a Chagas' disease endemic area. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 105-114, 1994.

OLIVEIRA, E. C. *et al.* Neuropathy of gastrointestinal Chagas' disease: Immune response to myelin antigens. **Neuroimmunomodulation**, Basel, v. 16, p. 54-62, 2009.

OLIVEIRA JR., W. Forma indeterminada da Doença de Chagas. Implicações médico-trabalhistas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 54, n. 2, p. 89-91, 1991.

OLIVEIRA JR., W. Fase Crônica: Forma Indeterminada. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. p. 43-47.

OLIVEIRA JR., W. All-around care for patients with Chagas disease: a challenge for the XXI century. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, Suppl 1, p. 181-186, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of Chagas disease**. Geneva (WHO Technical Report Series, 905), 2002.

PEREIRA, V. R. A. *et al.* Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57Bl/6 mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 4, p. 435-440, 2003a.

PEREIRA, V. R. A. *et al.* Antibody isotype responses in BALB/c mice immunized with the Cytoplasmic Repetitive Antigen and Flagellar Repetitive Antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 823-825, 2003b.

PEREIRA, V. R. A. *et al.* Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. **Parasitology**, London, v. 129, n. 5, p. 563-570, 2004.

PEREIRA, V. R. A. *et al.* Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, Berlin, v. 96, n. 3, p. 154-161, 2005.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *et al.* Enzyme-linked immunoassay using recombinant *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi* can be employed for monitoring of patients with Chagas' disease after drug treatment. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 10, n. 5, p. 826-830, 2003.

PÉREZ-FUENTES, R. *et al.* Severity of chronic Chagas' disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 33, p. 293-299, 2003.

PIRON, M. *et al.* Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). **Transfusion**, Philadelphia, v. 48, n. 9, p. 1862-1868, 2008.

PITTELLA, J. E. H. O processo de avaliação em ciência e a indicação de Carlos Chagas ao prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 42; n. 1; p. 67-72, 2009.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet**, London, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.

PRIMAVERA, K. S. C. *et al.* Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 10, p. 2101-2104, 1988.

PRIMAVERA, K. S. C. *et al.* Chagas'disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 172-80, 1990.

PUNUKOLLU, G. *et al.* Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 115, n. 3, p. 279-83, 2007.

REIS, D. D. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 48, n.5, p. 637-642, 1993.

REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. (Org.). **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 297-343.

RIBEIRO, B. M. *et al.* Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. **Human Immunology**, New York, v. 69, n. 8, p. 484-489, 2008.

SÁ FERREIRA, J. A. *et al.* Immunoglobulins and other serological parameters in Chagas' disease: evidence for increased IgA levels in the chronic digestive form. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 52, p. 266-270, 1983.

SANTOS, R. R. *et al.* Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 490-495, 2004.

SARTORI, A. M. C. *et al.* Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 101, n. 1, p. 31–50, 2007.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 2, p.75-85, 2007.

SILVA, E. D. *et al.* Use of EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 16, p. 132-136, 2002.

SILVEIRA, A. B. *et al.* Characterization of the presence and distribution of Foxp3(+) cells in chagasic patients with and without megacolon. **Human Immunology**, New York, v. 70, n. 1, p. 65-67, 2009.

STEINDEL, M. *et al.* Characterization of *T. cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 60, p. 25-32, 2008.

TALVANI, A. *et al.* Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 38, n. 7, p. 943-950, 2004.

UMEZAWA, E. S. *et al.* Changes in isotype composition and antigen recognition of Anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 10, p. 407-413, 1996.

VAGO, A. R. *et al.* PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophageal tissues of patients with chronic Chagas' disease. **Lancet**, London, v. 348, p. 891–892, 1996.

VAGO, A. R. *et al.* Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* Directly from Tissues of Patients with Chronic Chagas Disease. **American Journal of Pathology**, New York, v. 156, n. 5, p. 1805-1809, 2000.

VASCONCELLOS, D. Fase Crônica: Forma Digestiva. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. p. 48-58.

VERÇOSA, A. F. A. *et al.* Chagas' Disease: IgG Isotypes against Cytoplasmatic (CRA) and Flagellar (FRA) Recombinant Repetitive Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Chronic Chagasic Patients. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 21, p. 271-276, 2007.

VITELLI-AVELAR D. M. *et al.* Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3CD16CD56 Natural Killer T cells and CD4CD25 regulatory T lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 62, n. 3, p. 297-308, 2005.

VIRREIRA, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Typing of genotype (sub) lineages in megacolon samples from Bolivian patients. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 100, n. 3, p. 252-255, 2006.

XU-AMANO, J. *et al.* Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. **International Immunology**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 433-445, 1992.

ZAUZA, P. L.; BORGES-PEREIRA, J. Níveis séricos de IgG anti-*Trypanosoma cruzi* na evolução da cardiopatia chagásica crônica, no período de 10 anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 399-405, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente Chagásico



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTE CHAGÁSICO

Título do projeto: Avaliação do perfil isotípico das imunoglobulinas A de indivíduos chagásicos frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*.

Eu, _____, RG nº _____, expedido por _____, residente na _____, bairro _____, município _____, estado _____, usuário do telefone () _____ e/ou celular () _____, abaixo assinado, atesto que aceito participar desse estudo cujo objetivo é analisar a imunidade diante de substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas, como marcadores das formas clínicas crônicas da doença. Fui informado que como portador da doença de Chagas selecionado para o estudo terei 2 colheres de chá (10 ml) de meu sangue coletado através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou hematoma. Também fui informado que depois da coagulação de meu sangue no tubo, a parte líquida (soro) será separada e guardada a -20°C para depois ser avaliada quanto à dosagem de anticorpos (substâncias produzida pela imunidade), quando em contato com as substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas. Fui informado ainda que, se as substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas funcionarem como marcadores das formas clínicas crônicas da doença, serão de grande auxílio para direcionar a conduta médica relacionada ao tratamento de outros pacientes chagásicos no futuro. Fui informado que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo. Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do entrevistador e outra comigo. Atesto que entendi o conteúdo deste termo de consentimento livre e esclarecido, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo e que esclareci todas as minhas dúvidas com o (a) pesquisador (a) responsável pelo projeto.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Paciente

_____ Data: ____/____/____
Testemunha

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do responsável pelo projeto

Responsáveis pelo projeto:
Romero Henrique Teixeira Vasconcelos
Mestrando do Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do CPqAM/FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2561

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes
Tecnologista em Saúde Pública do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2561

Dra. Yara de Miranda Gomes
Pesquisadora Titular do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2559

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduo Saudável

Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA INDIVÍDUO SAUDÁVEL**

Título do projeto: Avaliação do perfil isotípico das imunoglobulinas A de indivíduos chagásicos frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*.

Eu, _____, RG nº _____, expedido por _____, residente na _____, bairro _____, município _____, estado _____, usuário do telefone () _____ e/ou celular () _____, abaixo assinado, atesto que aceito participar desse estudo cujo objetivo é analisar a imunidade diante de substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas, como marcadores das formas clínicas crônicas da doença. Fui informado que como indivíduo saudável selecionado para o estudo terei duas colheres de chá (10 ml) de meu sangue coletado através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou hematoma. Também fui informado que depois da coagulação de meu sangue no tubo, a parte líquida (soro) será separada e guardada a -20°C para depois ser avaliada quanto à dosagem de anticorpos (substâncias produzida pela imunidade), quando em contato com as substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas. Fui informado ainda que, se as substâncias presentes no parasita causador da doença de Chagas funcionarem como marcadores das formas clínicas crônicas da doença, serão de grande auxílio para direcionar a conduta médica relacionada ao tratamento de outros pacientes chagásicos no futuro. Fui informado que os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo. Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse do entrevistador e outra comigo. Atesto que entendi o conteúdo deste termo de consentimento livre e esclarecido, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo e que esclareci todas as minhas dúvidas com o (a) pesquisador (a) responsável pelo projeto.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do Paciente

_____ Data: ____/____/____
Testemunha

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do responsável pelo projeto

Responsáveis pelo projeto:
Romero Henrique Teixeira Vasconcelos
Mestrando do Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do CPqAM/FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2561

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes
Tecnologista em Saúde Pública do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2561

Dra. Yara de Miranda Gomes
Pesquisadora Titular do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ
Telefone para contato: 2101-2559

APÊNDICE C - Questionário de Pesquisa



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



FIOCRUZ

Ministério da Saúde

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

1. Nome: _____
 Prontuário HUOC nº: _____ Registro CPqAM: _____
 Data da coleta: _____ Amostra para: () Romero () Virginia () Myllena
2. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino
3. Idade: _____
 (1) De 0 a 12 anos (2) De 13 a 19 anos
 (3) De 20 a 59 anos (4) A partir de 60 anos
 (9) IGN
4. Situação trabalhista:
 (1) Empregado (2) Desempregado (3) Aposentado
 (4) Do lar (5) INSS (9) IGN
5. Endereço: _____
 Bairro: _____ Município: _____ Estado: _____
 Telefone: () - _____ Celular: () - _____
6. Município de nascimento: _____ Estado: _____
7. Forma de contaminação:
 (1) Vetorial (2) Transfusional (3) Congênita
 (4) Oral (5) Transplante de órgão (6) Acidente de laboratório
 (9) IGN
8. Exames clínicos convencionais:
 RX coração: (1) normal (2) dilatação (3) IGN
 ECG: (1) normal (2) anormal (3) IGN
 RX esôfago (1) normal (2) dilatação (3) IGN
9. Sorologia:
 IFI: (1) positivo (2) negativo (3) IGN
 HAI: (1) positivo (2) negativo (3) IGN
 ELISA: (1) positivo (2) negativo (3) IGN
10. Forma clínica crônica:
 (1) Forma cardíaca (2) Forma digestiva
 (3) Forma indeterminada (4) Forma mista
11. Medicação: (1) Sim - ano: _____ (2) Não

APÊNDICE D - Participação em congressos e resumos publicados**A) Participação em congressos**

- XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Recife, Março de 2009.
- Simpósio Internacional Comemorativo do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas, Rio de Janeiro, Julho de 2009.
- XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica, Salvador, 2009.
- XVI Congresso Brasileiro de Infectologia, Maceió, Outubro de 2009.

B) Resumos publicados

- VASCONCELOS, RHT; AMARAL, FN; VERCOSA, AFA; CARVALHO, C L; MELO, MFAD; LORENA, VMB; MORAIS, CNL; GOMES, YM. Padronização do ELISA para detecção de Imunoglobulina A em pacientes chagásicos crônicos utilizando o antígeno recombinante CRA de *Trypanosoma cruzi*. In: XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Recife, 2009.
- VASCONCELOS, RHT; AMARAL, FN; MELO, MFAD; LORENA, VMB; BRAZ, SCM; MORAES, AB; NAKAZAWA, M; GOMES, YM; MORAIS, CNL. Immunoglobulin A (IgA) antibodies from chronic chagasic patients against Cytoplasmatic Repetitive Antigen (CRA) of *Trypanosoma cruzi*. In: Simpósio Internacional Comemorativo do Centenário da Descoberta da Doença de Chagas, Rio de Janeiro, 2009.
- VASCONCELOS, RHT; AMARAL, FN; GOMES, YM; MORAIS, CNL. Standardization of an ELISA to detect IgA antibodies against Flagellar Repetitive Antigen (FRA) of *Trypanosoma cruzi* in serum of chronic chagasic patients. In: XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica, Salvador, 2009.
- VASCONCELOS, RHT; AMARAL, FN; MORAES, AB; CAVALCANTI, MGAM; GOMES, YM; MORAIS, CNL. Detecção de Imunoglobulina A contra o antígeno repetitivo flagelar de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos crônicos. In: XVI Congresso Brasileiro de Infectologia, Maceió, Outubro de 2009.

ANEXO

ANEXO A - Parecer de Aprovação do CEP-CPqAM/Fiocruz



Título do Projeto: Avaliação do perfil isotípico das imunoglobulinas A de indivíduos chagásicos frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*.

Pesquisador responsável: Romero Henrique Teixeira Vasconcelos

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 21/05/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 38/08

Registro no CAAE: 0038.0.095.000-08

PARECER Nº 070/2008

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

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 08 de setembro de 2011. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 08 de setembro de 2008.


D^{ra} Zilma Maria de Medeiros
Biomédica
Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 27/08/2009.