



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

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

MAYARA DA COSTA CHAMBELA

**AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS
SÉRICAS DE PACIENTES EM DIFERENTES ESTÁGIOS
DA DOENÇA DE CHAGAS**

Rio de Janeiro

2012

AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS SÉRICAS DE PACIENTES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA DE CHAGAS

MAYARA DA COSTA CHAMBELA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em ciências, área de concentração doenças infecciosas.

Orientadores: Dra. Liane de Castro e Dr. Gilberto Marcelo Sperandio da Silva

Rio de Janeiro

2012

MAYARA DA COSTA CHAMBELA

**AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS
SÉRICAS DE PACIENTES EM DIFERENTES ESTÁGIOS
DA DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em ciências, área de concentração doenças infecciosas.

Orientadores: Prof.^a Dra. Liane de Castro

Prof. Dr. Gilberto Marcelo Sperandio da Silva

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Dr. Pedro Emannuel Alvarenga Americano do Brasil (Presidente)
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC-FIOCRUZ)

Dr. Fabiano Borges Figueiredo (Membro titular)
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC-FIOCRUZ)

Dr. Sérgio Salles Xavier (Membro titular)
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Dra. Juliana de Meis (Membro suplente)
Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

Aos meus pais, Roseli e Reinaldo: por todo apoio e lições inesquecíveis.

Aos meus familiares, pelo estímulo constante.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois ele é a base de tudo.

Ao professor Dr. Gilberto Marcelo Sperandio da Silva, que me possibilitou o conhecimento mais profundo da pesquisa, pela orientação, pelo grande estímulo recebido durante todo o trabalho, pela amizade, e principalmente pela oportunidade.

À Dra. Liane de Castro, pela orientação, apoio, ensinamentos, correções, revisões e sugestões.

À Dra. Juliana de Meis pela incondicional colaboração, atenção, incentivo e ensinamentos.

Ao Dr. Alejandro, pelas oportunidades concedidas.

Aos Profissionais do Laboratório de Pesquisa Clínica em doença de Chagas, que em todos os momentos foram a força e o alicerce dos trabalhos. Agradeço ao profissionalismo, dedicação, envolvimento e preocupação de todos.

Aos funcionários da coleta e do Laboratório de Pesquisa em Farmacogenética, pelo apoio na obtenção das amostras.

Às amigas do mestrado, Fernanda, Grazielle e Thaís, pelo companheirismo de todas as horas.

A minha mãe, minha amiga, por estar sempre ao meu lado, e me ensinar a seguir sempre em frente e nunca desistir.

Ao meu pai, por me proporcionar esse sonho.

A toda minha família, que é o alicerce da minha vida.

Ao meu noivo, Gustavo, meu grande amigo, parceiro e principalmente meu grande amor, por toda paciência e companheirismo.

Aos meus futuros sogro e sogra, Luiz Carlos e Walkimeire, pelo apoio e carinho.

Aos pacientes participantes deste estudo, pela disponibilidade e contribuição.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram da realização deste trabalho.

E, desde já, aos membros da banca examinadora pela avaliação e pelas sugestões feitas com o intuito de melhorar o conteúdo desta dissertação.

“A coisa mais indispensável a um homem
é reconhecer o uso que deve fazer do seu
próprio conhecimento.”

Platão

Chambela, MC. **Avaliação das concentrações de citocinas séricas de pacientes em diferentes estágios da doença de Chagas**; Rio de Janeiro, 2012. 60 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

A resposta imune é muito importante para a proteção contra doenças. Estudos têm avaliado a resposta imunológica de pacientes com doença de Chagas na tentativa de explicar a fisiopatologia da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar as concentrações das citocinas séricas IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ em pacientes nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Foi realizado um estudo caso-controle de 115 indivíduos. Os indivíduos infectados foram divididos em estágios conforme o consenso brasileiro de doença de Chagas: indeterminados ou sem cardiopatia aparente (eletrocardiograma e ecocardiograma normais); cardíacos A (eletrocardiograma alterado e ecocardiograma normal); cardíacos C (eletrocardiograma e ecocardiograma alterados com ICC compensável) e cardíacos D (eletrocardiograma e ecocardiograma alterados com ICC refratária). Também foram incluídos indivíduos não infectados pelo *T. cruzi*. Foram incluídos 30 pacientes indeterminados; 31 cardíacos A; 14 cardíacos C, 11 cardíacos D e 29 indivíduos não infectados. Entre as citocinas pró-inflamatórias, o IFN- γ apresentou maior concentração sérica em relação às citocinas IL-12 e TNF- α . Os cardíacos no estágio A apresentaram maiores concentrações de TNF- α , entretanto houve uma queda significativa nas concentrações desta citocina à medida que observamos os estágios mais avançados da CCC. Tanto os indeterminados quanto os cardíacos apresentaram altos níveis de TNF- α e IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10, demonstrando um perfil predominante de Th1, com uma resposta imune não balanceada. Este estudo demonstrou uma proporcionalidade direta nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias em relação à FEVE, em todos os grupos de pacientes estudados, sugerindo que essa correlação poderia ser utilizada como um possível marcador de evolução para a CCC.

Palavras-chave: 1. Doença de Chagas; 2. Citocinas. 3. Biomarcador; 4. *T. cruzi*

Chambela, MC. **Evaluation of serum cytokine concentrations of patients in different clinical stages of Chagas' disease**; Rio de Janeiro; 2012. 60 s. Master [Science dissertation in Clinical Research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

The immune response is very important for protection against diseases. Studies have evaluated the immune response of patients with Chagas' disease in an attempt to explain the pathophysiology of the disease. The aim of this study was to evaluate serum concentrations of cytokines IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α and IFN- γ in patients in different clinical forms of Chagas' disease. We conducted a case-control study of 115 individuals. Infected individuals were divided into 4 stages as the Brazilian consensus of Chagas disease: indeterminate patients or without apparent heart disease (normal electrocardiogram and echocardiogram) cardiac patients on the stage A (electrocardiogram changes and normal echocardiogram), cardiac patients on the stage C (electrocardiogram and echocardiogram altered with compensable CHF) and cardiac patients on the stage D (electrocardiogram and echocardiogram changed with refractory CHF). Also were included uninfected individuals with *T. cruzi*. We included 30 indeterminate patients, 31 cardiac patients on the stage A, 14 cardiac patients on the stage C, 11 cardiac patients on the stage D and 29 uninfected individuals. Among the pro-inflammatory cytokines, IFN- γ showed higher serum levels in relation to IL-12 and TNF- α . The cardiac patients on the stage A had higher concentrations of TNF- α , however, there was a significant decrease in the concentrations of this cytokine in the same time that we observed the later stages of the CCC. Both indeterminate and cardiac patients showed high levels of TNF- α and IFN- γ and low levels of IL-4 and IL-10, demonstrating a dominant Th1 profile with an imbalanced immune response. This study demonstrated a direct proportionality in concentrations of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines with respect to the LVEF in all groups of patients, suggesting that this correlation could be used as a marker of progression to CCC.

Keywords: 1. Chagas disease, 2. Cytokines. 3. Biomarker. 4. *T. cruzi*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	Distribuição da Doença de Chagas nas Américas.....	4
FIGURA 2 –	Ciclo biológico do <i>T.cruzi</i>.....	6
FIGURA 3 –	Box plot das medianas dos níveis das citocinas séricas em pacientes nos diferentes estágios da doença de Chagas.....	29
FIGURA 4 –	Correlação (Spearman) entre FEVE e os níveis de IL-4, IL-10, IL-12, TNF-α e IFN-γ.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Estadiamento do comprometimento miocárdico na cardiopatia chagásica crônica.....	9
TABELA 2 –	Grupos selecionados para o estudo.....	19
TABELA 3 –	Características gerais dos pacientes com doença de Chagas.....	24
TABELA 4 –	Características dos pacientes com CCC.....	26
TABELA 5 -	Produção das citocinas entre não doentes e pacientes com doença de Chagas.....	29

LISTA DE SÍMBOLOS

APC	Células Apresentadoras de Antígenos
Benefit	<i>Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis</i>
BZN	Benzonidazol
CARD	Cardíacos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CCC	Cardiopatía Chagásica Crônica
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
ELISA	Imunoensaio Enzimático
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HAI	Hemaglutinação Indireta
IC	Insuficiência Cardíaca
iECAs	inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IL-18	Interleucina-18
IND	Indeterminados
IQR	Intervalo Interquartil
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LapClin-Chagas	Laboratório de Pesquisa Clínica em doença de Chagas
Md	Mediana
MHC	Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade
ml	Mililitros
ND	Não Detectável
NI	Não Infectados
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfato Salino)
PBST	Phosphate Buffered Saline-Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
pg	Picograma
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TA	Temperatura Ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Linfócito T helper Padrão 1
Th2	Linfócitos T helper Padrão 2
TGF-β	Fator de Crescimento Tumoral-beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
VD	Ventrículo Direito
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1.1.1	HISTÓRICO.....	3
1.1.2	EPIDEMIOLOGIA	4
1.1.3	<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> E A TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	5
1.1.4	DIAGNÓSTICO.....	7
1.1.5	ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA DE CHAGAS.....	8
1.1.6	TRATAMENTO.....	10
1.1.6.1	TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	10
1.1.6.2	TRATAMENTO DA IC NA DOENÇA DE CHAGAS.....	10
1.1.7	RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS.....	11
1.1.8	RESPOSTA CELULAR E LINFÓCITOS T.....	12
1.1.9	CITOCINAS.....	13
1.1.9.1	CITOCINAS ANTIINFLAMATÓRIAS: IL-10 E IL-4.....	14
1.1.9.2	CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS: IL-12, IFN- γ E TNF- α	15
2	OBJETIVO GERAL.....	17
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	METODOLOGIA.....	18
3.1	DESENHO DO ESTUDO.....	18
3.2	INDIVÍDUOS DO ESTUDO.....	18
3.2.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	19
3.2.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	20
3.3	MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS	20
3.3.1	COLETA DE DADOS	20
3.3.2	DOSAGEM DE CITOCINAS SÉRICAS.....	20
3.4	ESTIMATIVA DO TAMANHO AMOSTRAL.....	22
3.5	ANÁLISE DE DADOS.....	22
4	RESULTADOS.....	23

4.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	23
4.1.1	ANÁLISE DAS CITOCINAS SÉRICAS ENTRE PACIENTES INDETERMINADOS E CCC.....	25
4.2	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA CCC.....	25
4.2.1	ANÁLISE DAS CITOCINAS SÉRICAS ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES COM CCC.....	27
4.3	CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS SÉRICAS ENTRE INDIVÍDUOS NÃO INFECTADOS PELO <i>T. CRUZI</i> E PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS.....	27
4.4	ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS NOS DIFERENTES GRUPOS.....	28
4.5	CORRELAÇÃO ENTRE FEVE E OS NÍVEIS DE CITOCINAS SÉRICAS....	30
5	DISCUSSÃO.....	32
6	CONCLUSÕES.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Apesar do descobrimento da doença de Chagas ter mais de cem anos e dos muitos avanços realizados no seu combate, reduzindo substancialmente a incidência dessa doença, a transmissão por barbeiro ainda persiste com focos de infestação menores e difíceis de detectar (ABAD-FRANCH et al. 2011). A cada ano na América Latina, cerca de 40 mil novos casos são relatados, com uma estimativa de 12.000 mortes (WHO, 2011).

A doença de Chagas pode ser dividida em fases aguda e crônica quanto ao tempo após a infecção. A primeira geralmente é assintomática, e quando sintomática apresenta características clínicas de uma infecção, que pode acometer o coração com gravidade variável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Dos pacientes que evoluem para fase crônica, cerca de 30% apresentam complicações cardíacas, que vão desde a presença de anormalidades silenciosas, até formas graves, como a insuficiência cardíaca refratária ou morte súbita. Sendo a cardiopatia chagásica crônica (CCC) considerada a principal causa de morbimortalidade da doença, com grande impacto social.

As diferenças das manifestações clínicas com diferentes graus de gravidade observadas na doença de Chagas têm sido associadas à resposta imune do hospedeiro (MOSCA et al. 1985). No entanto, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que favorecem a predisposição a uma determinada forma clínica nos indivíduos acometidos por essa doença. Os resultados são controversos, justificando a necessidade da ampliação de estudos clínicos que avaliem as concentrações de citocinas nos diferentes estágios da doença de Chagas.

Estudos *in vitro* realizados com células mononucleares do sangue periférico (CMSP), do tipo TCD4+ e monócitos, demonstraram que a resposta celular de pacientes com doença de Chagas tanto na forma indeterminada quanto cardíacos produzem uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 (interleucina-12), IFN- γ (Interferon-gama) e TNF- α (Fator de necrose tumoral-alfa) e antiinflamatórias (IL-4 e IL-10) (VITELLI-AVELAR et al. 2008). Desse modo, acredita-se que a resposta celular seja fundamental na evolução clínica da doença. De fato, alguns estudos sugerem que as diferenças nas concentrações séricas de citocinas podem ser utilizados como marcadores imunológicos para os diferentes estágios da doença de Chagas (WARD et al. 1999; D'AVILA et al. 2009). Neste contexto, este estudo avaliou as concentrações

sélicas de citocinas pró e antiinflamatórias nos diferentes estágios da doença de Chagas, a fim de avaliar o papel das citocinas na fisiopatologia da doença de Chagas.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 HISTÓRICO

A tripanossomíase americana ou doença de Chagas, considerada uma das patologias de grande distribuição no continente latino americano, completou em 2009 cem anos de seu descobrimento, um fenômeno científico de Carlos Justiano Ribeiro Chagas, ocorrido em 1909, na qual comunicou ao mundo científico a descoberta dessa nova doença humana, durante uma expedição à Lassance, Cidade do interior de Minas Gerais (CHAGAS, 1918; MALAFAIA: RODRIGUES, 2010). No ano anterior, Chagas já havia identificado o seu agente causal, o protozoário flagelado *T. cruzi*, denominado assim em homenagem a Oswaldo Cruz, e o inseto transmissor, conhecido como barbeiro. A descoberta do barbeiro, juntamente com o descobrimento do *T. cruzi* no inseto e no sangue de Berenice foram considerados um marco na história da ciência brasileira (KROPF et al. 2000).

A descoberta de Chagas teve grande reconhecimento nos meios científicos nacionais e internacionais, e fez com que ele fosse contemplado com importantes distinções acadêmicas. Em 1910, foi nomeado membro da Academia Nacional de Medicina. Em 1912, recebeu o prêmio Schaudinn em Hamburgo, considerada uma grande premiação naquela época, além da ocupação de cargos administrativos de grande valor na área biomédica: o de diretor do Instituto Oswaldo Cruz e o de primeiro diretor do Departamento Nacional de Saúde Pública (COUTINHO; DIAS, 1999; KROPF et al. 2000).

O seu trabalho lhe conferiu duas indicações à grande premiação em ciência, o Nobel, em 1913 e 1921, mas a premiação pode não ter ocorrido em 1913 por causa da oposição que ele enfrentou no Brasil por parte de alguns médicos e pesquisadores da época, que questionaram a existência da doença de Chagas (PITTELLA, 2009). Apesar de não ter recebido o prêmio Nobel, o trabalho de Carlos Chagas foi reconhecido por vários pesquisadores e instituições nacionais e internacionais (PITTELLA, 2009).

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA

Apesar do descobrimento da doença de Chagas ter mais de cem anos e dos muitos avanços realizados no seu combate, reduzindo substancialmente a incidência dessa doença, a transmissão por barbeiro ainda persiste com focos de infestação menores e difíceis de detectar e, portanto, métodos de vigilância altamente sensíveis são necessários (ABAD-FRANCH et al. 2011). A cada ano na América Latina, cerca de 40 mil casos novos são relatados, com uma estimativa de 12.000 mortes (WHO, 2011) (Figura 1).



Figura 1. Distribuição da Doença de Chagas nas Américas (Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009;104(Supl.1):31-40).

Como qualquer outra doença parasitária, a doença de Chagas está intimamente relacionada ao desenvolvimento social e econômico (WHO, 2002). De acordo com a história, a doença de Chagas era considerada uma endemia da área rural, que afetava populações rurais pobres, com distribuição nas Américas. Porém nas últimas décadas tem sido identificada em grandes cidades, sendo uma consequência da urbanização e da migração da população rural (PARKER; SETHI, 2011). Alguns anos atrás a doença de Chagas passou a ser um problema para países considerados não endêmicos, como Canadá, Espanha e Estados Unidos, países com grande quantidade de imigrantes latinos. Nesses países a transmissão ocorre principalmente por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e via congênita (SCHMUNIS, 2007).

O grande número de indivíduos infectados e o risco de contaminação por transfusões sanguíneas foram definitivos para a criação da Comissão Intergovernamental de Doença de Chagas, em 1991. Formada por países do Cone Sul, a comissão tinha a intenção de criar um plano para eliminar o vetor e interromper a transmissão por via transfusional, que por fim conseguiu uma importante redução de casos na região (SILVEIRA, 2002). Em 2006, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) deu ao Brasil uma certificação referente à eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor (*Triatoma infestans*) e pela via transfusional (DIAS, 2006).

O sucesso das ações adotadas para o controle da doença fez com que a Assembléia de saúde mundial acreditasse que a erradicação da doença de Chagas poderia ser atingida em 2010, porém especialistas intergovernamentais americanos entenderam que o conceito de erradicação não era aplicável para a tripanossomíase americana, uma vez que a doença de Chagas não possui tratamento ideal na fase crônica e o *T. cruzi* ainda circula em todo o continente americano. Assim, embora a tripanossomíase americana não possa ser erradicada, uma grande redução na transmissão da doença tem sido observada em várias áreas endêmicas, em razão da sustentabilidade das atividades de controle da doença (DIAS et al. 2008; DIAS, 2009).

1.1.3 TRYPANOSSOMA CRUZI E A TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS

O *T. cruzi* em seu ciclo biológico possui várias formas evolutivas: tripomastigota, amastigota e epimastigota. Elas são caracterizadas pela diferenciação celular. A forma

tripomastigota possui forma alongada com cinetoplasto posterior ao núcleo e uma extensa membrana ondulante, a amastigota é arredondada ou oval, com flagelo curto interno e membrana ondulante ausente, e a epimastigota é alongada, com cinetoplasto anterior ao núcleo e membrana ondulante curta (NEVES et al. 2005). Os tripomastigotas são as formas infectantes, elas são encontradas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e no aparelho digestivo do hospedeiro invertebrado. Os amastigotas são formas representativas do estágio intracelular do parasito no organismo do hospedeiro vertebrado, e os epimastigotas são as formas encontradas no hospedeiro invertebrado, consideradas não infectantes (REY, 2002).

O ciclo de vida do *T. cruzi* se inicia quando o vetor (invertebrado), ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado, elimina em suas fezes, os tripomastigotas, que através de mucosas ou por ferimentos da pele, infectam o hospedeiro, já no organismo deste, os tripomastigotas ganham a forma de amastigotas. Quando as células estão cheias de parasitos, eles mudam de forma mais uma vez, originando novos tripomastigotas que serão sugados pelo vetor. No intestino do inseto, os parasitos sofrem novas transformações, formando epimastigotas e tornam-se novamente as formas infectantes tripomastigotas, que são eliminados junto com as fezes do vetor, completando, assim, o ciclo (Figura 2) (COURA, 2008).

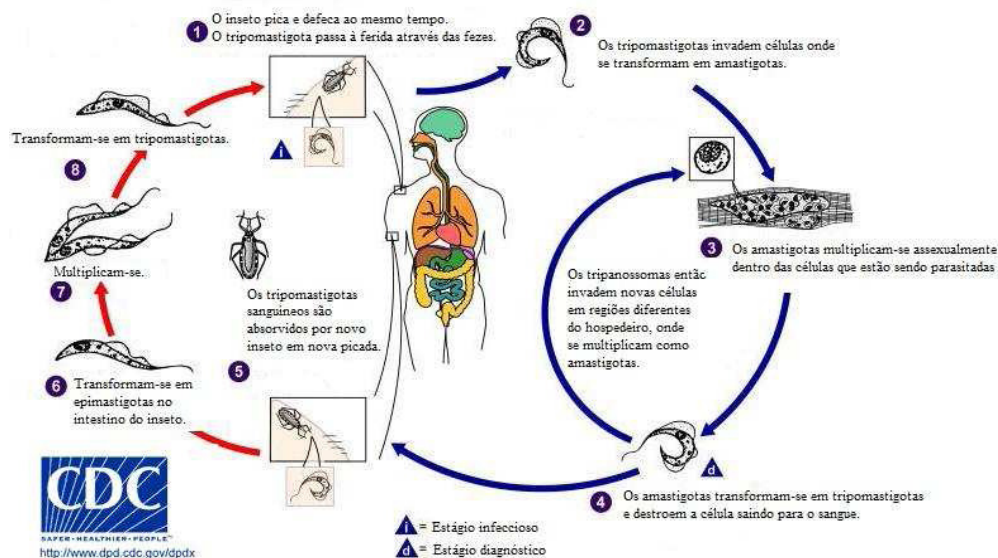


Figura 2. Ciclo biológico do *T. cruzi*
(Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

Após a infecção, geralmente cerca de sete dias há um período de incubação, em seguida ocorre a invasão de vários tipos de células (endoteliais, epiteliais e fibroblastos). Contudo, o parasito tem preferência por células musculares, neurônios, células adiposas e fagócitos mononucleares (REY, 2002).

A forma de transmissão mais frequente da doença de Chagas é a vetorial, através de insetos hematófagos, conhecidos popularmente como barbeiros, da família Reduviidae, oriundos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (LANA; TAFURI, 2005). A doença também pode ser adquirida através de: transfusão sanguínea, transmissão vertical ou congênita e água ou alimentos contaminados com fezes do parasito (DIAS; COURA, 1997; COURA, 2007). Existem outras vias de transmissão consideradas secundárias, como acidentes de laboratório, transplante de órgãos contaminados e transmissão sexual (COURA, 2007).

1.1.4 DIAGNÓSTICO

O que define a fase aguda do ponto de vista laboratorial é a presença do parasita no sangue e, portanto o exame que deve ser solicitado é a pesquisa direta no sangue do *T. cruzi* a fresco. A pesquisa em gota espessa ou em lâmina corada apresenta sensibilidade menor, ou seja, a parasitemia deve estar elevada para que haja resultado positivo. Em caso de exame negativo, se a suspeita clínica persistir, pode-se partir para métodos de concentração do parasito, como o método de Strout ou microhematócrito (VERONESI; FOCACCIA, 2005)

A forma crônica da doença é caracterizada por baixa parasitemia e alta quantidade de anticorpos. O xenodiagnóstico e a hemocultura são os métodos convencionais indiretos utilizados para o diagnóstico parasitológico na fase crônica para a identificação do *T. Cruzi*, porém apresentam baixa sensibilidade. O diagnóstico na fase crônica é essencialmente sorológico, utilizam-se dois testes de princípios distintos ou com preparações distintas antigênicas que detectam anticorpos anti-*T. cruzi*. Os testes de HAI (hemaglutinação indireta), IFI (Imunofluorescência indireta), ELISA (imunoensaio enzimático) são exemplos de testes sorológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) que se baseia na amplificação de seqüências nucleotídicas específicas do *T. cruzi*, nesta fase tem indicação quando os testes sorológicos são duvidosos, pois vem demonstrando elevada sensibilidade na detecção de DNA de *T. cruzi* em

amostras de pacientes com doença de Chagas crônica, apesar do número baixo de parasitos circulantes nessa fase (PORTELA-LINDOSO; SHIKANAI-YASUDA, 2003).

Apesar da técnica da PCR ser controversa para o diagnóstico da doença de Chagas, atualmente, ela pode ser recomendada dependendo da situação. A técnica de PCR é recomendada para o diagnóstico da doença de Chagas crônica somente quando os testes sorológicos são inconclusivos pelo Consenso de doença de Chagas Brasileiro e Chileno (BRASIL et al. 2010).

1.1.5 ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é dividida nas fases aguda e crônica quanto ao tempo após a infecção, a fase aguda da doença dura em média de um a três meses após a infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Na maioria dos indivíduos nesta fase, a infecção é assintomática, quando sintomática, os principais sintomas são: febre prolongada, mal-estar, aumento do fígado, baço e linfonodos, edema subcutâneo, e em casos particulares de transmissão vetorial podem aparecer os sinais de porta de entrada de *T. cruzi* através da pele (Chagomas de inoculação) ou pela membrana mucosa ocular (complexo oftalmo-ganglionar (Sinal de Romana) (RASSI et al. 2010).

A fase crônica da doença inicia-se cerca de quatro a dez semanas após o final da fase aguda (RIBEIRO; ROCHA, 1996). Na fase crônica, existem quatro formas clínicas: a forma indeterminada, a forma cardíaca, a forma digestiva (acometimento do esôfago ou intestino grosso, que podem se apresentar como megaesôfago e megacólon, respectivamente, acalasia ou distúrbios de motilidade) e a forma mista (acometimento cardíaco e digestivo no mesmo paciente). Dos pacientes que passam para fase crônica, de 50-60% permanecem na forma indeterminada e não apresentam sinais ou sintomas relacionados ao coração ou o sistema digestivo. Cerca de 30% apresentam complicações cardíacas, que vão desde a presença de anormalidades silenciosas, até formas graves, como a insuficiência cardíaca refratária ou morte súbita, e 8-10% apresentam a forma digestiva, caracterizada por vários graus de alterações anatômicas e funcionais do esôfago e/ ou do cólon (HIGUCHI et al. 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A forma indeterminada pode durar de dez a trinta anos ou por toda a vida do doente. Geralmente, o indivíduo com doença de Chagas nessa fase permanece por um longo período de latência clínica, que consiste na presença da infecção (diagnosticada por sorologia e/ou métodos

parasitológicos diretos), associada à ausência de sinais e sintomas, e exame eletrocardiográfico e radiológico de tórax, esôfago e cólon normais (PRATA, 2001).

A forma cardíaca da doença de Chagas possui como principais características: o seu caráter fibrosante (avaliado como o mais significativo dentre as miocardites); a frequência das arritmias cardíacas combinada com distúrbios da condução do estímulo atrioventricular e intraventricular; a alta incidência de morte súbita; fenômenos tromboembólicos; e aneurismas ventriculares. A CCC é considerada como a principal responsável pela alta morbimortalidade da doença de Chagas, com grande impacto social. A CCC possui como fator prognóstico mais importante, a disfunção sistólica global do ventrículo esquerdo. Para avaliar a função miocárdica, utiliza-se a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), obtida através do ecocardiograma, um exame não invasivo e de fácil realização, que permite identificar o estadiamento da cardiopatia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A Insuficiência Cardíaca (IC) Crônica pode se instalar 20 anos ou mais após a infecção (ANDRADE et al. 2011). A apresentação clínica mais comum é a IC biventricular, em alguns casos com predominância do ventrículo direito (VD). O prognóstico se torna pior à medida que o quadro de IC desenvolve e as arritmias se tornam incontroláveis (ANDRADE et al. 2011). Uma classificação para IC foi adotada pelos Consensos Brasileiro de IC, considerando-se a função sistólica ventricular esquerda. Essa classificação é de grande utilidade, pois permite a identificação de subgrupos diferentes com CCC, utilizando o eletrocardiograma e ecocardiograma e, portanto, permite a uniformização de condutas para o manejo do paciente com cardiopatia chagásica crônica, do ponto de vista prognóstico e terapêutico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1 - Estadiamento do comprometimento miocárdico na cardiopatia chagásica crônica.

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

Adaptado do Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2005).

1.1.6 TRATAMENTO

1.1.6.1 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

Somente dois medicamentos estão disponíveis para uso, o Nifurtimox e o Benzonidazol (BZN) desenvolvidos nas décadas de 60 e 70 respectivamente (CROFT et al. 2005; ANDRADE et al. 2011). Entretanto, esses medicamentos atuam nas formas sanguíneas do *T. cruzi* e são mais eficazes na fase aguda da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Para o uso de Nifurtimox, a dose recomendada é de 15 mg/kg/dia (comprimido contém 150 mg de substância ativa) em crianças ou casos agudos, e de 8 a 10 mg/kg/dia em adultos, por 60 dias de tratamento, com dose diária por via oral dividida em três vezes, porém no Brasil não é disponível para uso contínuo, somente o BZN encontra-se disponível, sendo atualmente produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE). A dose recomendada para o uso do BZN (comprimido contém 100 mg da substância ativa) é de 10 mg/kg/dia em crianças ou casos agudos e 5 mg/kg/dia em crônicos, por 60 dias, com duas tomadas. A dose diária máxima recomendada é de 300 mg e, portanto, adultos com peso acima de 60 kg, deve ser calculada a dose total esperada, com o tempo de tratamento estendido além dos 60 dias. Deste modo, o paciente com o peso de 65 kg deverá receber 300 mg por dia, durante 65 dias, e o de 70 kg, essa mesma dose diária por 70 dias até o máximo de 300 mg (ANDRADE et al. 2011).

1.1.6.2 TRATAMENTO DA IC NA DOENÇA DE CHAGAS

Para o tratamento da IC na doença de Chagas incluem-se medidas farmacológicas dependentes do estágio do acometimento cardíaco. No estágio B quando há disfunção ventricular leve ou mais acentuada é possível recomendar o uso de inibidores da enzima de conversão da angiotensina (iECAs) (Captopril, Enalapril, entre outros), além de alguns bloqueadores do receptor β -adrenérgico (carvedilol, metoprolol) (THE SOLVD INVESTIGATORS, 1992; BOCCHI et al. 2009).

Quando o paciente apresenta IC, além do uso de iECAs (GRANGER et al. 2003) e do carvedilol (PACKER et al. 1996), recomenda-se o bloqueio suplementar do sistema renina angiotensina pelo uso do bloqueador do receptor da aldosterona (Espironolactona) (PITT et al. 1999; BOCCHI et al. 2009). Tais estratégias aumentam a sobrevida de pacientes com IC, além de melhorar a sua qualidade de vida. Nesse sentido, é consenso que tais drogas sejam recomendadas no estágio C da doença de Chagas (RASSI et al. 2010). Além destes medicamentos, outras classes de medicamentos são indicadas com o objetivo de aliviar os sintomas e atingir a compensação da IC. Estes são os digitálicos (digoxina) e, principalmente, os diuréticos de alça (Furosemida). Nos pacientes com retenção hídrica refratária ao bloqueador da aldosterona e a diuréticos de alça, pode-se associar o uso de tiazídicos (Hidroclorotiazida). O tratamento dos pacientes em estágio D segue as mesmas recomendações do estágio C, porém com a necessidade de internação hospitalar e a associação de procedimentos especiais como o transplante cardíaco (JESSUP et al. 2009).

Outras classes de fármacos podem ser necessárias conforme surjam complicações específicas. Por exemplo, a associação de fibrilação atrial irá requerer o uso de drogas para o controle da resposta ventricular (digitálicos) ou a reversão e manutenção do ritmo sinusal (antiarrítmicos classe III – amiodarona e sotalol). A fibrilação atrial assim como aneurismas ventriculares com trombos intramurais irão requerer também a anticoagulação oral (BOCCHI et al. 2009; JESSUP et al. 2009).

1.1.7 RESPOSTA IMUNE NA DOENÇA DE CHAGAS

As principais manifestações clínicas observadas na doença de Chagas devem-se a resposta imune elaborada pelo hospedeiro contra o parasita, desta forma, o estudo das características imunológicas da resposta imune do hospedeiro que poderia explicar o estabelecimento das respostas protetora ou patológica tem norteadas as pesquisas nesta área (MOSCA et al. 1985).

Os aspectos imunológicos envolvidos nos mecanismos da patogênese da doença de Chagas são explicados por duas teorias principais: a primeira defende o papel essencial da persistência do parasita no hospedeiro como uma das principais causas de patologia, enquanto a segunda postula que uma resposta autoimune é responsável pelo dano observado nos tecidos dos órgãos afetados

de indivíduos com doença de Chagas, devido à diferença entre a gravidade das lesões observadas durante a fase crônica e a extrema baixa carga parasitária na circulação e nos tecidos (HYLAND; ENGMAN, 2006; DUTRA; GOLLOB, 2008).

Segundo Morris et al. (1990) a doença de Chagas é causada por uma reação inflamatória progressiva multifocal, uma vez que as lesões teciduais nas formas clínicas cardíaca e digestiva são caracterizadas pela ocorrência de reação inflamatória nos tecidos cardíacos e na rede neuronal mioentérica, respectivamente. Já a resposta imune da forma clínica indeterminada é caracterizada por possuir um equilíbrio “saudável” entre o parasita e o hospedeiro, pois apesar de ser infectado pelo parasita, o indivíduo com essa forma clínica, não apresenta sinais e sintomas da doença, e possui predominância da resposta antiinflamatória (DUTRA et al. 2009).

Apesar das teorias serem controversas, elas são importantes na busca pela compreensão do estabelecimento e manutenção da patologia da doença de Chagas, pois independente da origem dos antígenos que provocam a resposta imune durante a infecção, acredita-se que o sistema imune do hospedeiro, particularmente a resposta celular, desempenha um papel essencial no desenvolvimento das manifestações patológicas através da reação inflamatória (DUTRA et al. 2009).

1.1.8 RESPOSTA CELULAR E LINFÓCITOS T

A resposta celular é mediada por linfócitos T, e tem como papel principal combater as infecções causadas por microorganismos intracelulares, por este motivo a imunidade mediada por células é considerada muito importante na ação contra o *T. cruzi*, pois impede a replicação da forma intracelular amastigota deste parasita (ABBAS; LICHTMAN, 2007; OLIVEIRA et al. 2008).

Os fatores relacionados ao parasita (virulência, carga parasitária e o tipo da cepa) são importantes no desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas, porém a resposta imune do hospedeiro, especialmente as células T, é crucial no desenvolvimento da patologia tanto em modelos experimentais quanto em humanos (SOUZA et al. 2007).

O infiltrado inflamatório originado do miocárdio de pacientes com doença de Chagas cardíaca é composto por macrófagos, células NK, células B e principalmente de células T,

demonstrando a capacidade dessas células reagirem contra antígenos do parasito na doença de Chagas (DUTRA et al., 2005; CUNHA-NETO et al. 2009).

Tanto nas fases aguda e crônica, os linfócitos TCD4⁺ são as principais células responsáveis pela indução da imunidade protetora, ativando macrófagos e linfócitos TCD8⁺ através das citocinas IL-2 e IFN- γ . Outro grupo importante de células T é o formado pelos linfócitos TCD8⁺, que controlam a replicação do parasita e permitem a resistência do hospedeiro, através da produção de IFN- γ (BRENER; GAZZINELLI, 1997).

Os receptores de antígenos de linfócitos T reconhecem apenas fragmentos peptídicos de proteínas antigênicas que são ligados a moléculas de apresentação especializadas, chamadas de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O MHC é dividido nas classes I e II, encontrado na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs), e são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺, respectivamente. Dessa maneira, ativam as células para agirem na defesa do hospedeiro (MURPHY et al. 2010). Neste sentido, estudos da ativação de células T em pacientes com doença de Chagas crônica, têm mostrado que indivíduos nas diferentes formas clínicas da doença apresentam alta expressão de moléculas de MHC de classe II, e também elevada frequência de linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ circulantes. Menezes et al. (2004) acharam correlação entre a frequência de células TCD4⁺ e a expressão da citocina antiinflamatória IL-10 em pacientes indeterminados, sugerindo um perfil modulatório. Já nos pacientes cardíacos, células T ativadas, principalmente linfócitos TCD8⁺ foram encontrados em infiltrados inflamatórios de lesões cardíacas, essas células foram associadas com a expressão da citocina inflamatória TNF- α (DUTRA et al. 2005; DUTRA et al. 2009).

1.1.9 CITOCINAS

As citocinas são pequenas proteínas produzidas por diversas células, mas principalmente por linfócitos e macrófagos ativados, geralmente em resposta a um estímulo, e são importantes mediadores, que regulam a duração e intensidade das respostas por meio de ligação a receptores específicos (MURPHY et al. 2010).

As citocinas podem ser classificadas de acordo com suas ações em: citocinas antiinflamatórias e pró-inflamatórias. As citocinas antiinflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, Fator de Crescimento Tumoral-beta (TGF- β)) reduzem a resposta inflamatória por meio da diminuição das

citocinas pró-inflamatórias e da supressão da ativação de monócitos. Já as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e IFN- γ) promovem a ativação do processo inflamatório, auxiliam na eliminação de patógenos, levando à ativação dos macrófagos, células NK, células T e células B e proliferação de imunoglobulinas. No nível sistêmico, as citocinas induzem febre, aumentam a síntese de proteínas, e promovem o recrutamento de células inflamatórias para os sítios da inflamação (MARQUES et al. 2007).

As citocinas podem também ser classificadas pela fonte de produção do linfócito T helper, quando produzidas pelos linfócitos T helper 1 (Th1) ou T helper 2 (Th2). Os linfócitos Th1 liberam citocinas pró-inflamatórias, enquanto os linfócitos Th2 liberam citocinas antiinflamatórias (MARQUES et al., 2007). Pesquisadores acreditam que o balanceamento entre as citocinas pró e antiinflamatórias seja fundamental no desenvolvimento das diferentes formas clínicas dos pacientes com doença de Chagas (D'AVILA et al., 2009). Essa hipótese é sustentada por trabalhos realizados com pacientes que mostraram que a alta produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) está associada com baixos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 em indeterminados, enquanto os cardíacos apresentam uma resposta Th1 irregular (BAHIA-OLIVEIRA et al. 1998; CORREA-OLIVEIRA et al. 1999; RIBEIRAO et al. 2000).

Uma das razões que incentiva o estudo das citocinas na doença de Chagas é a identificação das citocinas envolvidas no controle do parasitismo no hospedeiro vertebrado, e quais favorecem o parasitismo tecidual. O entendimento do papel das diferentes citocinas na resposta imune protetora e na suscetibilidade do hospedeiro permite entender a ação dessas citocinas nos mecanismos regulatórios da resposta imune, e como participam da patologia influenciando na evolução clínica da doença de Chagas (ABRAHAMSOHN, 2011).

Devido ao papel das citocinas na resposta imune, elas estão associadas de forma direta com as doenças resultantes das infecções. Na doença de Chagas, trabalhos demonstraram que as citocinas são importantes tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção em pacientes com doença de Chagas (RIBEIRAO et al. 2000; FERREIRA et al. 2003).

1.1.9.1 CITOCINAS ANTIINFLAMATÓRIAS: IL-10 E IL-4

A IL-10 é uma citocina produzida por resposta Th2, que tem ação inibitória sobre a resposta Th1, na qual reforça sua participação na regulação da resposta imune. Além de regular

negativamente a secreção de citocinas por Th1, inibe também as ações ativadoras de TNF- α e IFN- γ desativando a transcrição e tradução de genes de macrófagos. A IL-10 controla a resposta imune geral, a resposta inflamatória e o dano tecidual.

Outra citocina produzida pela resposta Th2, a IL-4, tem a capacidade de estimular a produção de anticorpos, inibir a ativação de macrófagos e suprimir a imunidade mediada por células Th1 (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

Contudo, experimentos realizados em camundongos demonstraram que a inibição desta citocina leva ao aumento da produção de IFN- γ , conseqüentemente o parasitismo no hospedeiro é menor, porém com inflamação acentuada pode levar o hospedeiro ao óbito (ABRAHAMSOHN, 2011).

1.1.9.2 CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS: IL-12, IFN- γ E TNF- α

A IL-12 é uma citocina indutora da produção de IFN- γ , produzida por células dendríticas e macrófagos (MURPHY et al., 2010). Esta citocina atua no controle do parasitismo do tecido cardíaco, inflamação e resistência do hospedeiro à infecção aguda, é essencial na resposta inata do parasitismo por *T.cruzi*, resposta essa considerada importante para a ativação da resposta imune adaptativa e para a resistência inicial do organismo às infecções (ABRAHAMSOHN, 2011; MICHALOWSKY et al. 2001).

Abrahamsohn & Coffman (1995) mostraram a importância desta citocina durante a infecção aguda experimental com *T. cruzi*, descrevendo que o bloqueio da IL-12 resultou na diminuição da produção de IFN- γ e NO (óxido nítrico), confirmando que a produção de IFN- γ no início da infecção é dependente de IL-12. Em outra vertente, Muller et al. (2001) demonstraram que o IFN- γ pode ser produzido independente da IL-12, sendo esta produção mediada pela citocina IL-18.

O IFN- γ é a citocina mais importante produzida pelas células Th1, pois é um potente ativador de macrófagos (ABBAS; LICHTMAN, 2007). Com a intenção de avaliar o papel do IFN- γ na doença de Chagas, pesquisadores observaram que camundongos na fase aguda da

infecção, que receberam anticorpo monoclonal anti-IFN- γ apresentaram maior parasitemia (TORRICO et al., 1991).

A resistência do hospedeiro durante a fase aguda da infecção tem sido relacionada com a síntese de IFN- γ , reduzindo a parasitemia, devido à indução da produção de NO em macrófagos. A produção de IFN- γ é regulada pelas citocinas IL-10, IL-4 e o fator transformador de crescimento- β (TGF- β) (GAZZINELLI et al. 1992). Dados da literatura demonstraram que na fase crônica da doença, em pacientes, células mononucleares do infiltrado inflamatório cardíaco produzem alta quantidade de IFN- γ e outras citocinas, como TNF- α , IL-7 e IL-15, e baixa produção de IL-4 e IL-10 (ABEL et al. 2001; FONSECA et al. 2007).

Igualmente ao IFN- γ , o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória importante, pois tem um papel crítico no desenvolvimento da resposta imune, controlando a infecção pelo *T. cruzi*. Tanto IFN- γ como TNF- α são potentes ativadores das funções microbidas de macrófagos e, portanto, a neutralização destas citocinas *in vivo* ou *in vitro*, aumenta o parasitismo no hospedeiro (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995). Além da função citada acima, o TNF- α é responsável pela ativação de leucócitos inflamatórios, potenciação da lise mediada por linfócitos T citotóxicos e co-estimulação dos linfócitos T (MURPHY et al. 2010).

Em relação à produção das citocinas antiinflamatórias e pró-inflamatórias em pacientes nas diferentes formas clínicas da doença, esses dados mostram-se bastante heterogêneos e controversos. Trabalhos anteriores mostraram que níveis mais elevados de IFN- γ e TNF- α relacionados a níveis mais baixos de IL-4 e IL-10, são encontrados nas formas cardíacas ou nas formas mais graves, e níveis altos de IL-10 e níveis moderados de IFN- γ estão associados com pacientes na forma indeterminada (CORREA-OLIVEIRA et al. 1999; GOMES et al. 2003). No entanto, outros trabalhos demonstraram correlação oposta entre a gravidade da doença e uma menor produção de IFN- γ (LAUCELLA et al. 2004). Por outro lado Ward et al., 1999 não observaram diferenças na produção de IFN- γ e TNF- α entre pacientes com diferentes formas da doença. Em relação a IL-12, a produção desta citocina juntamente com outras foi avaliada em pacientes com as formas indeterminada e cardíaca e em indivíduos não infectados, porém não observaram diferença na produção desta citocina entre os grupos (LLAGUNO et al. 2011).

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar as concentrações de citocinas séricas em pacientes com doença de Chagas

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1.1 Analisar as concentrações de citocinas antiinflamatórias (IL-4 e IL-10) e pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α e IFN- γ) nos diferentes estágios da doença de Chagas.
- 2.1.2 Descrever as concentrações das citocinas em pacientes com doença de Chagas e indivíduos não infectados.
- 2.1.3 Avaliar o papel das citocinas na fisiopatologia clínica da doença de Chagas.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo caso-controle realizado no período de agosto de 2010 até julho de 2011, entre pacientes em diferentes estágios da doença de Chagas e indivíduos com sorologia negativa para doença de Chagas. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IPEC em 26/04/2010 sob o número 0007.0.009.000-10, no intuito de garantir o consentimento dos pacientes envolvidos, assim como a responsabilidade do pesquisador sob os dados gerados e publicação dos resultados da pesquisa.

3.2 INDIVÍDUOS DO ESTUDO

Os pacientes regularmente acompanhados no ambulatório de doença de Chagas (LapClin-Chagas), Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz (IPEC-FIOCRUZ). Participaram desse estudo 115 indivíduos. Os casos foram definidos como aqueles portadores da doença de Chagas, divididos nos seguintes grupos: indeterminados, cardíacos no estágio A, C e D. Os controles foram os indivíduos com suspeita de doença de Chagas atendidos no LapClin-Chagas e confirmados negativos para doença de Chagas através de sorologia negativa. Para a primeira análise os casos foram os cardíacos e os controles foram os indeterminados, para avaliar as diferenças entre os cardíacos, os casos foram subdivididos nos diferentes estágios e comparados entre si. Para uma segunda análise os casos foram todos os pacientes portadores da doença de Chagas e os controles os indivíduos não infectados. A tabela 2 resume os grupos participantes desse estudo.

Tabela 2 – Grupos selecionados para o estudo

Grupo	Estadiamento da cardiopatia chagásica crônica*	Descrição
Indivíduos não infectados (n=29)	-	Indivíduos com sorologia negativa para doença de Chagas
Inderminado (n=30)	Sem cardiopatia aparente	Eletrocardiograma e ecocardiograma normais
Grupo A (n=31)	A	Eletrocardiograma alterado e ecocardiograma normal com fração de ejeção $\geq 55\%$
Grupo C (n= 14)	C	Disfunção do ventrículo esquerdo e ICC compensada; ecocardiograma alterado com fração de ejeção $< 35\%$
Grupo D (n=11)	D	Disfunção do ventrículo esquerdo e ICC descompensada; ecocardiograma alterado com fração de ejeção $< 35\%$
Total (n=86)		

* Classificado pelo Consenso Brasileiro de doença de Chagas

3.2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo pacientes com doença de Chagas acompanhados no IPEC, com seguimento corrente, diagnóstico confirmado por meio de no mínimo dois testes sorológicos – Elisa, IFI ou HAI. Pacientes na forma indeterminada (com eletrocardiograma e fração de ejeção ventricular normal). Pacientes com infecção crônica para doença de Chagas, com histórico de comprometimento miocárdico (com eletrocardiograma e/ou fração de ejeção ventricular alterados). Voluntários não infectados, com sorologia negativa para doença de Chagas.

Outro critério utilizado na seleção dos pacientes foi o aceite dos mesmos em participar do estudo, após a explicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aplicado pela equipe do projeto.

3.2.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do ensaio os pacientes que apresentaram evidências de cardiopatia não chagásica, como: cardiopatia reumática, isquêmica, congênita e hipertensiva e aqueles que não possuíam acompanhamento regular no IPEC. Além disso, foram excluídas gestantes e indivíduos com doença gastrointestinal e outras co-morbidades como HIV, tuberculose, neoplasia, alergias, diabetes, outros agravos. Também foram excluídos pacientes que faziam parte do projeto *Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis* (Benefit), criado justamente para avaliar o efeito do Benzonidazol no tratamento de pacientes com a doença de Chagas cardíaca. Mais de mil pacientes participam do estudo, que envolve centros de pesquisas no Brasil, Colômbia, Argentina, Bolívia e El Salvador. Como esse projeto é mascarado e não se sabe quem são os pacientes que utilizam o medicamento e quem são os que utilizam o placebo, foi decidido que esses pacientes deveriam ser excluídos, uma vez que o tratamento poderia interferir na resposta imunológica dos pacientes.

3.3 MATERIAIS, PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS

3.3.1 COLETA DE DADOS

Foram elaborados formulários para coleta de dados provenientes dos pacientes com doença de Chagas. Dados que foram coletados a partir da análise e estudo dos prontuários dos pacientes: sexo, idade, escolaridade, cor, a FEVE logo antes à data da coleta, conhecimento do paciente sobre o barbeiro.

3.3.2 DOSAGEM DE CITOCINAS SÉRICAS

A coleta de sangue foi feita até 1 ano após a realização do ecocardiograma. Uma amostra de 10 mL de sangue foi coletada uma única vez de cada paciente em tubos secos (tipo VacuTainer®). Para obtenção do soro, após a retração do coágulo, os tubos foram centrifugados

(1800 x g/10min a temperatura ambiente-TA). As alíquotas de soro foram adequadamente identificadas e armazenadas à temperatura de -70°C.

Foram avaliados os níveis séricos de citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ) presentes no soro de pacientes com doença de Chagas. Para a dosagem foi utilizada a técnica de ELISA específica para cada citocina. Este teste imunoenzimático foi realizado utilizando o Kit Ebioscience (todo o procedimento foi realizado seguindo instruções do fabricante).

Uma microplaca com 96 poços foi utilizada, na qual foram adicionados 100 μ l / poço de anticorpo de captura anti-citocina humana diluído (diluição: 1/250) no tampão de revestimento, em seguida a placa foi selada e incubada aproximadamente por 18 horas a 4°C na geladeira.

Após a incubação a placa foi lavada 5 vezes com 250 μ l/poço de tampão de lavagem (PBS-Tween 20 0,05% (PBST)), após a última lavagem a placa foi colocada sobre papel absorvente para retirar qualquer solução residual.

Em seguida a placa foi bloqueada com 200 μ l / poço de diluente do ensaio 1 vez concentrado e incubada à temperatura ambiente (TA) por 1 hora, a incubação a placa foi lavada com PBST por 5 vezes.

Após a lavagem, 100 μ l/poço dos padrões (citocinas recombinantes) e 100 μ l/poço das amostras foram adicionadas em triplicatas. A placa foi coberta e incubada aproximadamente por 18 horas a 4 ° C e após esse período a placa foi lavada por 5 vezes com PBST.

A detecção foi realizada com 100 μ l/ poço de anticorpo anti-citocina conjugado à biotina, diluídos (1/250) em diluente de ensaio uma vez concentrado. A placa foi selada e incubada à TA por 1 hora.

Após lavar por 5 vezes com PBST, foram adicionados 100 μ l / poço de avidina- peroxidase (HRP) diluída (1/250) em diluente de ensaio uma vez concentrado. A placa foi selada e incubada à TA por 30 minutos.

Em seguida a placa foi lavada com PBST, preenchendo toda a capacidade volumétrica dos poços por 1 a 2 minutos antes da aspiração. Esse procedimento foi repetido por 7 vezes.

Foram adicionados 100 μ l/poço de solução de substrato TMB. A placa foi incubada a TA por 15 minutos. A reação foi bloqueada com 50 μ l/poço de “solução Stop” (H₂O + Ácido clorídrico), e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 450 nm. Todo o procedimento foi

realizado segundo instruções do fabricante. A técnica de ELISA foi realizada no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo do IOC.

O programa SoftMax versão 5.3 foi utilizado para a obtenção da média da triplicata e para a determinação das concentrações de citocinas das amostras através da construção de uma curva-padrão obtida com a diluição seriada das citocinas recombinantes identificando a sensibilidade do ensaio para cada citocina.

3.4 ESTIMATIVA DE TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho amostral para estimar as concentrações de citocinas frente aos diferentes estágios da doença de Chagas foi estimado com nível de significância de 5 %, desvio padrão= 20 e poder do teste= 80%, chegando-se ao tamanho da amostra de 20 pacientes portadores de doença de Chagas em cada grupo e 20 indivíduos não infectados.

3.5 ANÁLISE DOS DADOS

Os aplicativos EpiData e Statistical Package for the Social Sciences 16.0 (SPSS Inc., Chicago IL) foram utilizados para entrada e análise de dados, respectivamente. Foi aplicado teste de normalidade de Kolmogorov Sminov nos valores das citocinas, indicando testes não paramétricos. O tratamento estatístico foi composto pela análise descritiva, com variáveis numéricas descritas através da mediana (Md), seguida de IQR (Intervalo Interquartil). O teste U de Mann-Whitney ou o teste Kruskal-Wallis foram utilizados para associar a produção das citocinas com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Utilizamos o teste do Qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher para variáveis categóricas. As correlações foram determinadas graficamente pela técnica Lowess e testadas utilizando-se Spearman para comparar os níveis das citocinas com a FEVE. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Após a inclusão dos voluntários no estudo, todos os prontuários dos 86 pacientes foram apurados e os dados de interesse foram coletados. Em relação às características gerais dos pacientes, 38 (44,2%) foram do sexo masculino e 48 (55,8%) foram do sexo feminino. As idades variaram de 28 a 76 anos com mediana de 59 anos, considerando todos os pacientes. Em relação a FE geral dos pacientes, a mediana foi de 65 (IQR= 35 a 72%) (Tabela 3).

Foram selecionados 30 pacientes com a forma indeterminada, e 56 com a forma cardíaca. Observou-se predominância de mulheres tanto no grupo dos indeterminados quanto dos cardíacos, 16 (53,3%) e 32 (57,1%), respectivamente. A mediana das idades foram 56 para a forma indeterminada e 62 para a forma cardíaca. Em relação à cor, foram observados 43 (50,0%) brancos, 10 (11,6%) negros e 33 (38,4%) pardos. A análise da escolaridade mostrou que 1 paciente (1,2%) possuía ensino superior, 14 (16,3%) pacientes possuíam ensino médio, 63 (73,3%) possuíam ensino fundamental e 8 (9,3%) eram analfabetos. Quanto ao conhecimento sobre a doença, somente 18 (20,9%) pacientes relataram conhecer o barbeiro, 4 (4,7%) não conheciam, e 64 (74,4%) não tinham registros no prontuário quanto ao conhecimento do barbeiro. Em relação às FEVE dos pacientes, observou-se que os pacientes com a forma indeterminada tinham mediana significativamente maior (68.5%), que os pacientes cardíacos (60%) (Tabela 3).

Tabela 3. Características gerais dos pacientes com doença de Chagas (N=86)

	Indeterminados	Cardíacos	Total	P-valor*
Total	30	56	86	
Sexo^a				0.9114
Feminino	16 (53.33)	32 (57.14)	48 (55.81)	
Masculino	14 (46.67)	24 (42.86)	38 (44.19)	
Idade^b				0.0016
Mediana (IQR)	56 (49.25-58.75)	62 (56.75-67.25)	59 (54-64)	
Cor^c				0.6639
Branca	17 (56.67)	26 (46.43)	43 (50)	
Negra	3 (10)	7 (12.5)	10 (11.63)	
Parda	10 (33.33)	23 (41.07)	33 (38.37)	
Escolaridade^c				0.0869
Superior	1 (3.33)	0 (0)	1 (1.16)	
Médio	6 (20)	8 (14.29)	14 (16.28)	
Fundamental	18 (60)	45 (80.36)	63 (73.26)	
Analfabeto	5 (16.67)	3 (5.36)	8 (9.3)	
Conhece o barbeiro?^c				0.9152
Não	1 (3.33)	3 (5.36)	4 (4.65)	
Sim	7 (23.33)	11 (19.64)	18 (20.93)	
Ignorado	22 (73.33)	42 (75)	64 (74.42)	
FEVE próxima a data da coleta^b (%)				< 0.001
Mediana (IQR)	68.5 (65-73.75)	60 (28-71.25)	65 (35-72)	
Citocinas antiinflamatórias^b (pg/ml)				0.021
IL-4				0.021
Mediana (IQR)	2.4 (0.13-7.94)	0.8 (0-2.94)	1.3 (0-3.77)	
IL-10				0.033
Mediana (IQR)	10.0 (3.51-22.81)	5.5 (0-12.9)	6.8 (0.06-14.19)	
Citocinas pró-inflamatórias^b (pg/ml)				0.306
IL-12				0.306
Mediana (IQR)	11.44 (3.53-17.45)	7.2 (0.2-20.16)	9.8 (0.45-19.34)	
TNF-α				0.039
Mediana (IQR)	70.2 (5.5-137.26)	2.7 (0-115.19)	13.2 (0-126.5)	
IFN-γ				0.271
Mediana (IQR)	91.0 (14.8-193.5)	31.1 (12.18-171.66)	48.3 (13.4-178.37)	

Testes estatísticos: ^a Qui-quadrado de Pearson; ^b U de Mann-Whitney; ^c Exato de Fisher.

*p-valor<0,05

4.1.1 ANÁLISE DAS CITOCINAS SÉRICAS ENTRE PACIENTES INDETERMINADOS E CCC

Em relação à produção de IL-4, os pacientes indeterminados apresentaram de forma significativa níveis mais altos (2.4 pg/ml) que os pacientes cardíacos (0.8 pg/ml). Quanto à concentração de IL-10, os indeterminados também apresentaram de forma significativa níveis mais elevados (10.4 pg/ml) que os cardíacos (5.5 pg/ml) ($p= 0.033$). Quanto à concentração de IL-12, os pacientes indeterminados apresentaram maior produção (11.4 pg/ml) do que os cardíacos (7.2 pg/ml). Os indeterminados apresentaram de forma significativa níveis mais altos de TNF- α (70.2 pg/ml) que os cardíacos (2.7 pg/ml) ($p=0.039$). Em relação ao IFN- γ , houve aumento de concentração desta citocina no grupo dos indeterminados (91 pg/ml) em comparação aos cardíacos (31.1 pg/ml), porém não foram observadas associações significativas ($p= 0.271$) (Tabela 3).

4.2 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA CCC

Uma análise foi realizada subdividindo os 56 pacientes selecionados com CCC, de acordo com o estadiamento da doença de Chagas, em três grupos: grupo A (31 no estágio A), grupo C (14 no C) e grupo D (11 no D). Em relação ao sexo, 24 (42,86%) eram homens e 32 (57,14%) mulheres. Quanto à idade, o grupo C apresentou maior mediana (65 anos) comparado aos outros grupos (60 anos grupo A e 62 anos grupo D). Em relação à cor, observamos novamente a predominância de brancos considerando todos os cardíacos (46,4%), e também nas subdivisões deste grupo. Em relação à escolaridade, observou-se que 80,4% possuíam ensino fundamental, e que nenhum desses pacientes possuía ensino superior. A frequência de pacientes com ensino fundamental foi maior tanto analisando o grupo inteiro, quanto os subgrupos. Dos 56 pacientes, somente 11 (19,64%) relataram conhecer o barbeiro. A análise dos grupos quanto a FEVE apresentou mediana de 71% no grupo A, 33.5% no grupo C e 26% no grupo D (Tabela 4).

Tabela 4. Características dos pacientes com CCC

	A	C	D	Total	P-valor*
Total	31	14	11	56	
Sexo^a					0.763
Feminino	19 (61.29)	7 (50)	6 (54.55)	32 (57.14)	
Masculino	12 (38.71)	7 (50)	5 (45.45)	24 (42.86)	
Idade^b					0.140
Mediana (IQR)	60 (54-64)	65 (61.25-67.75)	62 (57-69.5)	62 (56.25-67.75)	
Cor^c					0.081
Branca	15 (48.39)	7 (50)	4 (36.36)	26 (46.4)	
Negra	3 (9.68)	2 (14.29)	2 (18.18)	7 (12.5)	
Parda	13 (41.94)	5 (35.71)	5 (45.45)	23 (41.1)	
Escolaridade^c					1.000
Superior	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Médio	5 (16.13)	2 (14.29)	1 (9.09)	8 (14.3)	
Fundamental	24 (77.42)	11 (78.57)	10 (90.91)	45 (80.4)	
Analfabeto	2 (6.45)	1 (7.14)	0 (0)	3 (5.4)	
Conhece o barbeiro?^c					0.767
Não	3 (9.68)	0 (0)	0 (0)	3 (5.36)	
Sim	7 (22.58)	2 (14.29)	2 (18.18)	11 (19.64)	
Ignorado	21 (67.74)	12 (85.71)	9 (81.82)	42 (75.0)	
FEVE próxima a data da coleta (%)^b					< 0.001
Mediana (IQR)	71 (65-73.75)	33.5 (28-35)	26 (21.5-27)	60 (28-71.75)	
Citocinas antiinflamatórias^b (pg/ml)					
IL-4^c					0.006
Mediana (IQR)	1.9 (0.23-3.6)	0.0 (0-0.98)	0.0 (0-1.12)	0.8 (0-3.04)	
IL-10^c					0.687
Mediana (IQR)	7.1 (3.96-11.14)	0.13 (0-15.89)	0.0 (0-12.96)	5.5 (0-12.92)	
Citocinas pró-inflamatórias^b (pg/ml)					
IL-12					0.661
Mediana (IQR)	11.2 (0.07-20.54)	3.4 (0.6-11.74)	2.0 (0.12-15.2)	7.2 (0.16-20.9)	
TNF-α					0.001
Mediana (IQR)	104.9 (0-144.13)	0.0 (0-1.94)	0.0 (0-1.54)	2.7 (0-118.73)	
IFN-γ					0.144
Mediana (IQR)	70.4 (13.34-212.41)	24.5 (17.61-31.07)	21.5 (11.5-86.48)	31.1 (11.8-176.13)	

Testes estatísticos: ^a Qui-quadrado de Pearson; ^b Kruskal-Wallis; ^c Exato de Fisher.

*p-valor<0,05

4.2.1 ANÁLISE DAS CITOCINAS SÉRICAS ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES COM CCC

Quando comparamos os diferentes grupos de pacientes cardíacos, observamos que o grupo A apresentou significativamente maior concentração de IL-4 (1.9 pg/ml) que os demais grupos (0.006). Observamos também uma maior concentração de IL-10 e IL-12 nos pacientes do grupo A, entretanto não significativa ($p=0.687$ e $p=0.661$, respectivamente). O grupo A também apresentou níveis mais altos (104.9 pg/ml) de TNF- α que os grupos C (0.0 pg/ml) e D (0.0 pg/ml) ($p=0.001$). Em relação à produção de IFN- γ , novamente o grupo A apresentou níveis mais altos (70.4 pg/ml) que os demais (24.5 pg/ml e 21.5 pg/ml), entretanto de forma não significativa ($p=0.144$) (Tabela 4).

4.3 CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS SÉRICAS ENTRE INDIVÍDUOS NÃO INFECTADOS PELO *T. CRUZI* E PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS

Houve maior concentração de IL-4 (2.56 pg/ml) ($p= 0.05$) entre os pacientes com doença de Chagas quando comparados com os indivíduos não infectados. Quanto à concentração das citocinas IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ entre os dois grupos houve diferença, mas não foi significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Produção das citocinas entre não doentes e pacientes com doença de Chagas

	Indivíduos sem doença de Chagas	Pacientes com doença de Chagas	Total	P-valor*
Total	29	86	115	
Citocinas antiinflamatórias^a (pg/ml)				
IL-4				
Mediana (IQR)	2.56 (0-15.96)	1.31 (0-3.77)	1.65 (0-5.96)	0.051
IL-10				
Mediana (IQR)	5.83 (0.79-65.45)	6.78 (0.06-14.19)	6.49 (0.5-16.1)	0.2715
Citocinas pró-inflamatórias^a (pg/ml)				
IL-12				
Mediana (IQR)	15.1 (1.29-22.2)	9.82 (0.45-19.34)	10.87 (0.8-21.17)	0.3151
TNF-α				
Mediana (IQR)	26.43 (6.98-102.83)	13.22 (0-126.5)	20.12 (0-122.97)	0.2172
IFN-γ				
Mediana (IQR)	37.51 (16.07-136.53)	48.33 (13.4-178.37)	44.73 (14.48-173.9)	0.8873

^a U de Mann-Whitney.

*p-valor<0,05

4.4 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS NOS DIFERENTES GRUPOS

A análise da concentração das citocinas em cada grupo foi realizada (Figura 3), observou-se que o IFN- γ foi a citocina que apresentou maior concentração na maioria dos grupos estudados, não doentes (37.51 pg/ml) (Figura 3A) pacientes indeterminados (91.00 pg/ml) (Figura 3B), cardíacos C (24.52 pg/ml) (Figura 3D) e D (21.5 pg/ml) (Figura 3E). Em contrapartida, no grupo dos cardíacos A, a citocina TNF- α foi a de maior concentração (104.9 pg/ml) (Figura 3C).

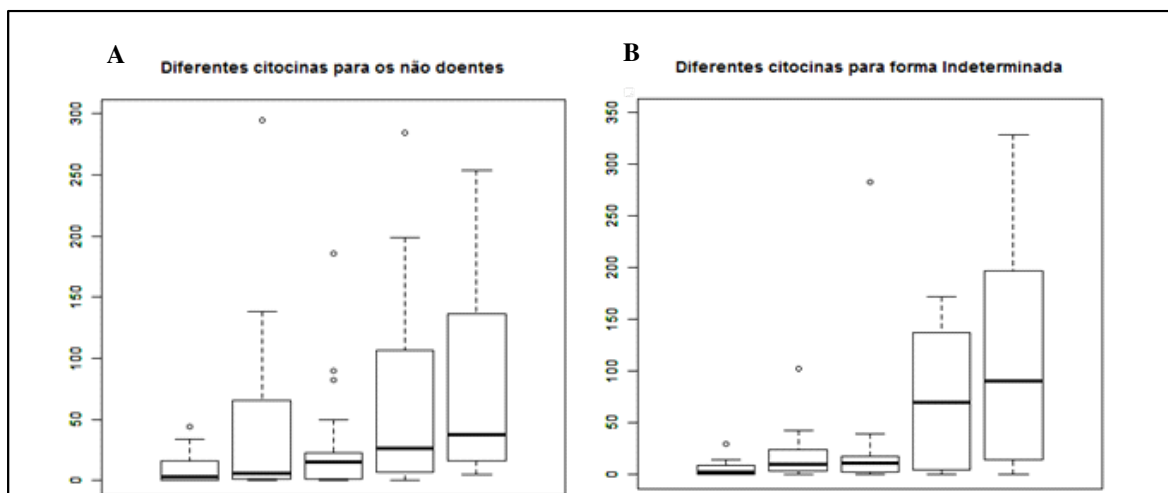


Figura 3. Box plot das medianas dos níveis das citocinas séricas em pacientes nos diferentes estágios da doença de Chagas: não doentes (A), indeterminados (B), cardíacos A (C), cardíacos C (D) e cardíacos D (E). Os níveis das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ (pg/ml). Para a visualização dos valores das citocinas, as escalas foram diferentes (figuras D e E).

4.5 CORRELAÇÃO ENTRE FEVE E OS NÍVEIS DE CITOCINAS SÉRICAS

Foi realizada a correlação entre a FEVE dos pacientes e os níveis das citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ) (Figura 4), observou-se correlação positiva entre a FEVE e as citocinas: IL-4 ($r=0.124$; $p=0.002$) (Figura 4A), IL-10 ($r=0.111$; $p=0.003$) (Figura 4B), TNF- α ($r=0.161$; $p=0.000$) (Figura 4D) e IFN- γ ($r=0.057$; $p=0.032$) (Figura 4E), ou seja, quanto maior foi a FEVE, maior foi a concentração da citocina. Entre FE e IL-12 houve correlação fraca ($r=0.04$; $p=0.069$) (Figura 4C).

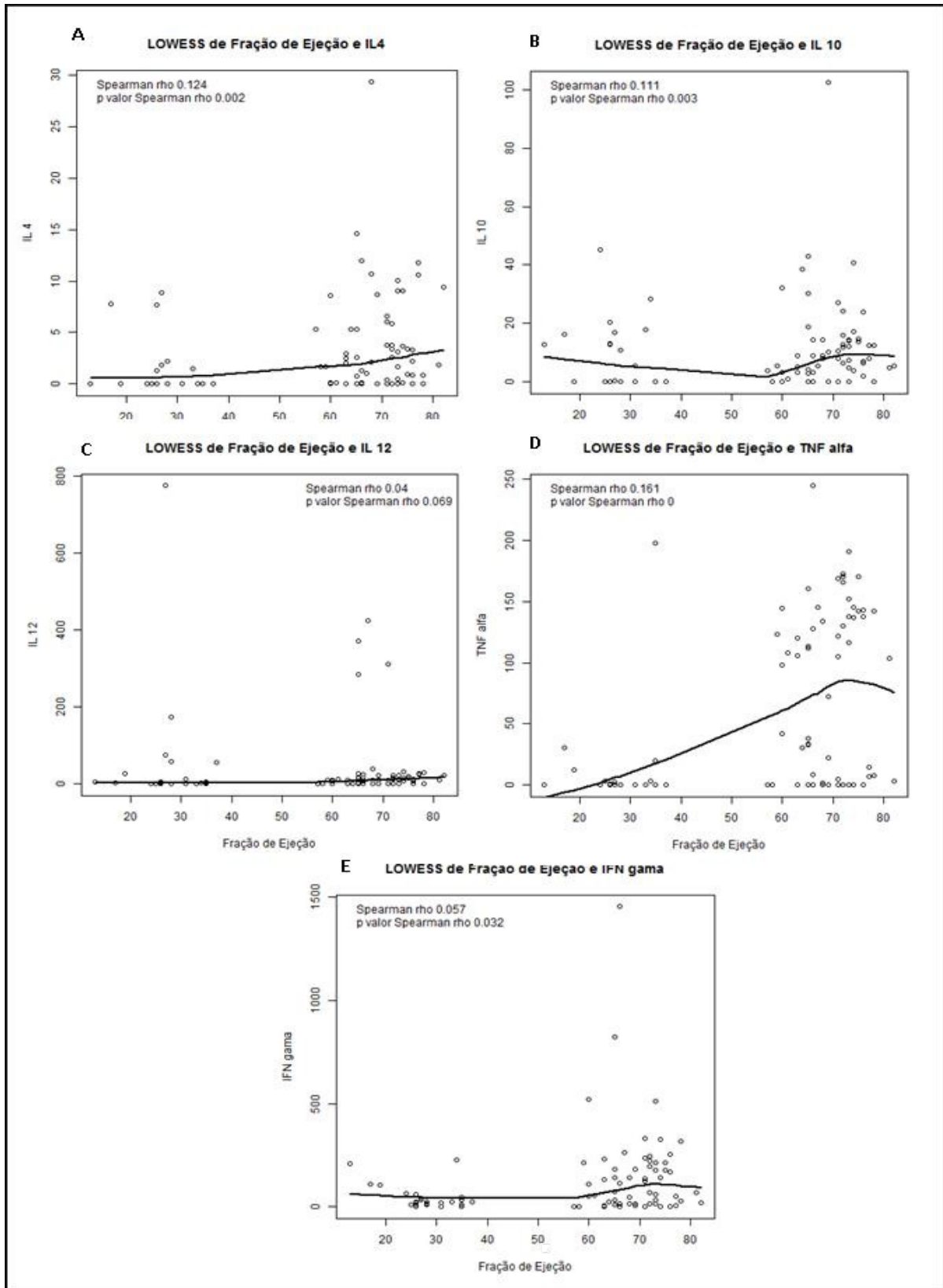


Figura 4. Correlação (Spearman) entre FEVE e os níveis de IL-4 (A), IL-10 (B), IL-12 (C), TNF- α (D), e IFN- γ (E). A correlação foi considerada significativa quando o $p < 0,05$. As escalas foram diferentes devido à dispersão dos dados.

5 DISCUSSÃO

A resposta imune desempenha um papel fundamental durante a infecção pelo *T. cruzi*, participando do controle ou da evolução da doença (DUTRA & GOLLOB, 2008). As citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α e IFN- γ) promovem a ativação do processo inflamatório, porém essa resposta é regulada pela ação das citocinas antiinflamatórias (IL-4 e IL-10). Estas citocinas promovem a resposta Th2 e regulam a resposta Th1, estando envolvidas tanto na resistência quanto nos mecanismos relacionados com a imunopatologia da doença (GAZZINELLI et al., 1992; FLÓREZ et al., 2011).

Uma das razões que incentiva o estudo das citocinas nessa doença é a identificação das mesmas envolvidas no controle do parasitismo no hospedeiro vertebrado. O entendimento desse controle nos permite avaliar o quanto os mecanismos regulatórios da resposta imune influenciam na evolução clínica da doença de Chagas (ABRAHAMSOHN, 2011).

Nossos resultados demonstraram que entre as citocinas pró-inflamatórias, o IFN- γ apresentou uma maior concentração sérica em relação às citocinas IL-12 e TNF- α . A citocina IFN- γ derivada das células T, também denominada fator estimulador de macrófago, tem importância na inflamação crônica. Embora estatisticamente não significativo observou-se que a concentração desta citocina era menor no grupo dos indivíduos não infectados por *T. cruzi*, sugerindo que a ativação da resposta imune nesses pacientes com doença de Chagas foi parecida com a ativação da resposta dos indivíduos não doentes deste estudo.

Embora o IFN- γ esteja em maior concentração no grupo dos infectados, foi observada uma queda significativa nessas concentrações à medida que observamos os pacientes nos estágios mais avançados da CCC. Acreditamos que esse fato se deve à diminuição da concentração de TNF- α ao longo da evolução dos pacientes na CCC, uma vez que existe um feedback positivo entre as produções de TNF- α e IFN- γ , ou seja, as células T efetoras reconhecem os antígenos ingeridos pelos macrófagos, e em resposta a este reconhecimento secretam o IFN- γ . Esta citocina ativa os macrófagos, que por sua vez secretam citocinas que induzem a inflamação, entre elas o TNF- α , que age aumentando a produção de quimiocinas, como resultado, mais células T são recrutadas para o local da infecção, recomeçando todo o processo de produção das citocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

Observamos neste estudo que a citocina pró-inflamatória TNF- α apresentou altas concentrações séricas na forma indeterminada e no estágio A da CCC. Semelhante ao IFN- γ , o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória importante, pois tem um papel crucial na resposta imune, controlando a infecção pelo *T. cruzi* (ABRAHAMSOHN; COFFMAN, 1995).

De fato, um grande aumento da concentração desta citocina foi observado nos pacientes agrupados no estágio A da CCC. Sabe-se que a grande expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α , contribui para a progressão da IC (FELDMAN et al. 2000). Esta informação foi corroborada por um estudo que demonstra que genótipos que conferem alta expressão de TNF- α podem ter um impacto sobre a mortalidade em pacientes CCC com disfunção ventricular grave (DRIGO et al. 2006).

Entretanto uma diminuição significativa nas concentrações desta citocina foi observada nos estágios mais avançados da CCC (C e D). Como demonstrado em vários estudos, esta diminuição “brusca” pode ser atribuída ao uso dos medicamentos para o tratamento da IC, incluindo o Captopril, o Carvedilol e Amiodarona, medicamentos estes utilizados pelos pacientes deste estudo (MATSUMORI et al. 1997; ZHAO; XIE, 2000; KURUM et al. 2007).

As concentrações plasmáticas aumentadas de TNF- α têm sido relatadas em pacientes com ICC há bastante tempo, pois esta citocina está potencialmente envolvida em muitos processos fisiopatológicos que levam à ICC, como a disfunção ventricular esquerda, remodelamento ventricular, miocardiopatia e edema pulmonar (LEVINE et al. 1990; MATSUMORI et al. 1994). Devido as altas concentrações de TNF- α possivelmente causarem a ICC, vários modelos experimentais foram realizados no intuito de descobrir uma forma de modular a produção de citocinas. A partir desse interesse, experimentos realizados, para comprovar a inibição do TNF- α pelo captopril foram realizados com células CMSP de pacientes com ICC, demonstrando que o TNF- α foi significativamente inibido por captopril (ZHAO; XIE, 2000). Uma das consequências principais do desempenho cardíaco reduzido é a ativação do sistema nervoso simpático e o sistema renina-angiotensina. A angiotensina II tem propriedades quimiotáticas, liga-se a monócitos/macrófagos, e induz a supra-regulação do TNF- α . Os iECAs são atualmente usados como terapia médica padrão na gestão da ICC, porque reduz a angiotensina II e, portanto, é possível que iECAs também tenham um efeito sobre a produção da citocina anti-inflamatória TNF- α (SCHINDLER et al. 1995). Outro estudo mostrou o efeito inibidor do Carvedilol sobre a concentração de TNF- α em pacientes com ICC (KURUM et al. 2007). O Carvedilol é um

bloqueador não preferencial dos receptores alfa1, beta1 e beta2 adrenérgicos. O bloqueio dos receptores alfa1 adrenérgicos produz vasodilatação periférica, redução da resistência vascular periférica e hipotensão arterial, entretanto o mecanismo pelo qual esse mecanismo suprime a concentração do TNF- α ainda não é bem esclarecido (KURUM et al. 2007). Quanto aos efeitos da Amiodarona sobre a concentração de TNF- α , observou-se inibição da produção desta citocina, sugerindo que este fato se deve pela redução de Potássio (MATSUMORI et al. 1997), devido ao bloqueio no interior dos canais de potássio pela Amiodarona, no entanto mecanismos pelos quais a Amiodarona modula a produção de citonas precisam ser melhor esclarecidos.

Nos indeterminados observou-se uma resposta imune normal como em qualquer outra infecção, demonstrado pelos níveis de IFN- γ e TNF- α elevados, e a baixa concentração de IL-12, uma vez que a IL-12 estimularia ainda mais a produção de IFN- γ e conseqüente exacerbação da resposta imune (MURPHY et al. 2010).

Do mesmo modo, Pissetti et al. (2009) demonstraram que o IFN- γ foi mais produzido em relação as outras citocinas em pacientes com doença de Chagas, porém também não observaram diferença entre pacientes e controles. Estudos anteriores acharam resultados semelhantes quanto à produção desta citocina entre pacientes indeterminados e cardíacos, sugerindo que concentrações semelhantes de IFN- γ podem ser encontradas tanto no soro de pacientes indeterminados quanto em cardíacos (WARD et al. 1999; D'ÁVILA et al. 2009).

Em relação ao TNF- α , Bachmaier et al. (1997) observou a participação desta citocina no recrutamento de linfócitos para o sítio de inflamação, deste modo, contribuindo com a progressão da reação inflamatória local na cardiopatia chagásica. Não somente em cardíacos leves como mostra este trabalho, mas também em pacientes assintomáticos foram observadas maiores concentrações de TNF- α (PISSETTI et al. 2009; LLAGUNO et al. 2011). Diferente dos nossos achados, estudos demonstraram que pacientes cardíacos graves são capazes de produzir altos níveis de TNF- α , devido a uma forte resposta de linfócitos T CD8⁺ responsável por causar uma inflamação exacerbada e dano tecidual (REIS et al. 1993; SOUZA et al. 2007). Esse fato também foi observado por Ferreira et al. (2003) e Talvani et al. (2004), porém comparando cardíacos graves com pacientes com cardiopatia leve.

A diferença na concentração de TNF- α observada nos nossos grupos de pacientes em relação aos estudos citados anteriormente pode ser explicada pela própria classificação dos pacientes nos determinados grupos (A, C, D), que de acordo com o consenso, os grupos são

classificados em diferentes percentuais de fração de ejeção. O estudo realizado por Ferreira et al. (2003) classifica as cardiopatias levando em consideração a fração de ejeção abaixo e acima de 50%, e Talvani et al. (2004) classifica os grupos em leve e grave, isso poderia estar agrupando os pacientes dos diversos estadiamentos em um único grupo, não permitindo a análise dos grupos de acordo com os respectivos graus de cardiopatias, o que prejudicaria a percepção da relação do TNF- α com a cardiopatia.

Quanto às citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10, no geral todos os pacientes apresentaram baixas concentrações. A IL-4 determina o perfil da resposta Th2 induzindo a proliferação e diferenciação de células B, e o aumento da expressão de MHC de classe II, favorecendo uma maior ativação da resposta Th2. Enquanto a citocina IL-10 inibe a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2 e IL-12, inibe ainda a proliferação de células Th1, mas não de Th2, diminuindo assim a função citolítica e secretora de citocinas por Th1, com isso facilita o desenvolvimento de respostas Th2, uma vez que a atividade principal dessas citocinas antiinflamatórias é determinar o perfil da resposta imune em Th2 (ABBAS; LICHTMAN, 2007). Nossos resultados demonstraram uma baixa ativação da resposta Th2, isto sugere uma consequência da ação moduladora negativa do IFN- γ , devido à alta concentração desta citocina sérica encontrada nos pacientes.

Em contraste, estudos realizados com CMSP derivadas de pacientes indeterminados e cardíacos com doença de Chagas e indivíduos não infectados, demonstraram uma menor concentração de IL-4 e IL-10 nos cardíacos, sugerindo que as altas concentrações encontradas nos indeterminados estariam controlando o desenvolvimento da doença (CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003). Em contrapartida, outros estudos demonstraram que não há diferença na produção de IL-10 entre os mesmos grupos analisados, a hipótese levantada pelos autores é que a relação e o balanço entre as citocinas pró e antiinflamatórias desempenham um papel importante na doença. (D'ÁVILA et al., 2009; LLAGUNO et al., 2011).

Levanta-se a hipótese de que a evolução da doença pode resultar de um delicado desequilíbrio das respostas Th1 e Th2, ou seja, das citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, respectivamente, representando uma peça fundamental no estabelecimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas e, portanto, torna-se fundamental o entendimento de que as duas respostas são importantes na defesa do hospedeiro contra as infecções (D'ÁVILA et al. 2009). A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias

intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares. Essas respostas são também antagônicas, uma vez que o IFN- γ modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada (MACHADO et al. 2004).

Nossos resultados demonstraram que no grupo dos indeterminados, a maior produção das citocinas pró-inflamatórias foi associada à menor produção das citocinas antiinflamatórias podendo indicar predominância da resposta Th1. Esses achados sugerem que pacientes com a forma indeterminada apresentando esse perfil inflamatório predominante, poderiam ser candidatos a desenvolver a forma cardíaca no futuro. Quando o inverso é observado, ou seja, o perfil predominante é de citocinas antiinflamatórias, sugere-se que esses pacientes são menos susceptíveis a evoluir para a forma cardíaca (LLAGUNO et al. 2011). Considerando que as medidas foram heterogêneas, seria possível “hipotetizar” que concentrações mais baixas de IFN- γ e mais altas de IL-4 seriam indicativas de melhor prognóstico do que os pacientes com concentração mais alta de IFN- γ e baixa de IL-4 (ABEL et al. 2001). Corroborando com essa hipótese, Bahia-Oliveira et. al. (1998) sugerem que é provável que altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias estejam envolvidas no desenvolvimento da CCC de forma mais rápida do que baixas concentrações.

Quanto ao balanceamento da resposta imune, nossos resultados apontam altos níveis de TNF- α e IFN- γ associados a baixos níveis de IL-4 e IL-10 tanto no grupo de pacientes indeterminados quanto no grupo dos cardíacos, demonstrando uma resposta imunológica não balanceada. Nossos dados estão de acordo com um estudo realizado em pacientes, que demonstra altos níveis de IFN- γ e baixos de IL-4 em resposta aos antígenos de *T. cruzi* (ABEL et al. 2001).

Os pacientes indeterminados apresentaram níveis mais elevados de IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ que os pacientes cardíacos. Esse fato também pôde ser observado na correlação entre a FEVE e os níveis destas citocinas, demonstrando uma correlação positiva, ou seja, quanto maior a FEVE, maior a produção destas citocinas, fato observado nos pacientes indeterminados deste estudo que apresentaram mediana de FEVE (68.5%), maior do que os cardíacos (60%). Portanto, a correlação entre a FEVE e a produção das citocinas nos cardíacos confirma essa correlação, veja que o grupo no estágio A (71%) apresentou maior produção de todas as citocinas em relação aos cardíacos C (33.5%) e D (26%).

Baseado nas informações científicas publicadas até o momento (FERREIRA et al. (2003), esperávamos os seguintes achados; o valor da FEVE deveria ser inversamente proporcional as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, podendo indicar assim um pior prognóstico, ou seja, quanto menor a FEVE e a presença da IC, maior seria a produção dessas citocinas. Por outro lado, as concentrações das citocinas antiinflamatórias deveriam ser diretamente proporcionais, quanto maior a FEVE maior seria a produção dessas citocinas, sugerindo um melhor prognóstico. Em contraste, nossos resultados apontam para uma proporcionalidade direta tanto nas concentrações de pró-inflamatórias quanto nas antiinflamatórias em todos os grupos de pacientes estudados. Esses dados estão de acordo com os observados por Soares et al. (2001); que demonstraram que existe inflamação também na ausência da insuficiência cardíaca em pacientes com doença de Chagas, sugerindo que marcadores inflamatórios poderiam estar elevados na forma indeterminada ou na cardiopatia mais leve.

A proporcionalidade direta entre a FEVE e a concentração das citocinas IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ poderia ser um possível marcador de evolução para a CCC, explicado pela correlação positiva entre elas. Outro possível marcador seria o TNF- α , pois as concentrações observadas dessa citocina foram mais elevadas nos cardíacos A. Esperávamos que os cardíacos nos estágios mais avançados da CCC apresentassem concentrações maiores ainda, contudo, uma queda acentuada da mesma foi constante nos estágios mais avançados da CCC, este achado, nos limita o uso de tal citocina como marcador de CCC mais grave, uma vez que vários estudos demonstram que os medicamentos para o tratamento da IC inibem a produção desta citocina. Assim, para comprovar o envolvimento de altas concentrações na evolução da CCC, seria apropriado realizar um estudo prospectivo com os pacientes cardíacos que ainda não necessitassem de medicamentos inibidores de TNF- α .

Pelo fato deste estudo ser caso-controle, e ter como característica a causalidade reversa, ou seja, não se sabe o que é causa e consequência, não é possível afirmarmos que essas citocinas são marcadores de evolução, somente podemos hipotetizar e sugerir-las como “possíveis” marcadores imunológicos, deste modo, torna-se mais uma vez necessário o estudo prospectivo para acompanharem esses pacientes e confirmarem essa hipótese.

Não foi possível incluir pacientes cardíacos no estágio B, pois ao longo da execução deste estudo houve mudanças na estratégia de análises necessárias para o entendimento das características de cada grupo entre os cardíacos.

Avanços nos estudos são necessários para melhor explorar a aplicação das citocinas como preditores de progressão na prática clínica. Ainda ficam as perguntas: o que fazer com os pacientes que mantêm a concentração de TNF- α alta? Seria a resposta imune não balanceada um sinal de alerta? Deveríamos tratar esses pacientes com fármacos para as formas intracelulares?

6 CONCLUSÕES

1. Entre as citocinas pró-inflamatórias, o IFN- γ apresentou maior concentração sérica em relação às citocinas IL-12 e TNF- α no grupo dos indeterminados e dos cardíacos C e D.
2. O TNF- α foi a citocina que apresentou maiores concentrações no grupo dos cardíacos A.
3. Houve uma queda significativa nas concentrações de IFN- γ e TNF- α à medida que observamos os estágios mais avançados da CCC.
4. Todos os grupos de pacientes apresentaram baixas concentrações das citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL-10 e da pró-inflamatória IL-12.
5. Os pacientes no estágio A apresentaram níveis mais elevados das citocinas antiinflamatórias IL-4, IL-10 e das pró-inflamatórias IL-12, TNF- α e IFN- γ que os pacientes cardíacos C e D.
6. Embora estatisticamente não significativas, foram observadas diferenças nas concentrações tanto das citocinas antiinflamatórias quanto das pró-inflamatórias, entre infectados e não infectados.
7. O TNF- α não foi considerado um bom marcador de CCC mais grave, uma vez que vários estudos demonstraram que os medicamentos para o tratamento da IC inibem a produção desta citocina.
8. Tanto os indeterminados quanto os cardíacos apresentaram altos níveis de TNF- α e IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10, demonstrando predominância da resposta Th1, mostrando uma resposta imunológica não balanceada.
9. Nossos resultados indicaram uma proporcionalidade direta tanto nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias quanto nas antiinflamatórias em relação à FEVE, em todos os grupos de pacientes estudados, sugerindo que essa correlação poderia ser utilizada como um possível marcador de evolução para a CCC.

REFERÊNCIAS

- Abrahamsohn IA, Coffman RL. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 1995; 155(8): 3955-63.
- Abrahamsohn IA. Citocinas na doença de Chagas: uma perspectiva pessoal sobre três décadas de pesquisa. In: < <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=184>>. Acesso em 21 nov. 2011.
- Abad-Franch F, Vega MC, Rolon MS, Santos WS, Rojas de Arias A. Community participation in Chagas disease vector surveillance: systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(6): e1207.
- Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico*, Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun*. 2001; 17(1): 99-107.
- Andrade JA, Marin-Neto JA, Paola AAV, Vilas-Boas F, Oliveira GMM, Bacal F et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. *Arq Bras Cardiol*. 2011; 97 Suppl 3: 1-47.
- Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Rocha MO, Moreira MC, Lemos EM, Luz ZM et al. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31(1): 127-31.
- Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LH, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2010; 10: 337.
- Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, et al. "III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica." *Arq Bras Cardiol*. 2009; 93(1): 3-70.
- Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997; 114(2): 103-10.
- Chagas CRJ. Trypanosomiase americana. Sinonimia: doença do barbeiro. *Revista do Brasil* 1918; 32: 1-33.
- Correa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94 Suppl 1; 253-5.
- Coura JR. Tripanosomose, Doença de Chagas. *Cienc. Cult*. 2003 Jan/Mar; 55 (1): 30-33.

- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102 Suppl 1; 113-22.
- Coura JR. Síntese das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 3147 p.
- Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009;104(Supl.1):31-40.
- Coutinho M, Dias JCP. A descoberta da doença de Chagas. *Cad Ciênc & Tec.* 1999; 16(2): 11-51.
- Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2005; 508-12.
- Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 Suppl 1(252-8).
- D'Avila DA, Guedes PM, Castro AM, Gontijo ED, Chiari E, Galvao LM. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (1): 100-5.
- Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chaga: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997.
- Dias JCP. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cadernos de Saúde Pública.* 2006; 22(10): 2020-2010.
- Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(2): 193-6.
- Dias JC. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 Suppl; 41-5.
- Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol.* 2005; 21(12): 581-7.
- Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21(3): 287-92.
- Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis D et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 Suppl 1; 208-18.

- Feldman AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, McTiernan C. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 537-544.
- Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98(3): 407-11.
- Florez O, Martin J, Gonzalez CI. Interleukin 4, interleukin 4 receptor-alpha and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. *Parasite Immunol.* 2011; 33(9): 506-11.
- Focaccia R, Veronesi R. *Tratado de Infectologia.* São Paulo, 2005.
- Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairena EC et al. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Scand J Immunol.* 2007; 66(2-3): 362-71.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* 1992; 22(10): 2501-6.
- Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* 2003; 71(3): 1185-93.
- Granger CB, McMurray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B et al. "Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial." *Lancet.* 2003; 362 (9386): 772-6.
- Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Martins Reis M, Metzger M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 2003; 60(1): 96-107.
- Hyland KV, Engman DM. Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. *Trends Parasitol.* 2006; 22(3): 101-2; author reply 103.
- Jessup M, Abraham WT, Casey DE, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG et al. "2009 focused update: ACCF/AHA Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation." *Circulation.* 2009; 119(14): 1977-2016.
- Kropf SA, Azevedo N, Ferreira LO. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2000; 5(2): 347-365.

- Kurum T, Tatli E, Yuksel M. Effects of Carvedilol on Plasma Levels of Pro-Inflammatory Cytokines in Patients with Ischemic and Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *Tex Heart Inst J*. 2007; 34(1): 52-9.
- Lana M, Tafuri WL. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: D. P. NEVES, editores. *Parasitologia Humana*. ed. São Paulo: Atheneu. 2005. v. p.73-100.
- Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG et al. Frequency of interferon- gamma -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis*. 2004; 189(5): 909-18.
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating concentrations of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1990: 236-241.
- Llaguno M, Pertili LA, da Silva MV, Bunazar P, Reges AM, Faleiros AC et al. The relationship between heart rate variability and serum cytokines in chronic chagasic patients with persistent parasitemia. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2011; 34(6): 724-35.
- Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *An bras Dermatol*. 2004; 79 (6): 647-664.
- Malafaia G, Rodrigues AS. [Centenary of the discovery of Chagas disease: challenges and prospects]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43(5): 483-5.
- Marques AH, Cizza G, Sternberg E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos. *Rev Bras Psiquiatr*. 2007; 29:27-32.
- Matsumori T, Yamada H, Suzuki Y, Matoba S, Sasayama. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J*. 1994; 72: 561-566.
- Matsumori A, Ono K, Nishio R, Nose Y, Sasayama S. Amiodarone inhibits production of tumor necrosis factor-alpha by human mononuclear cells: a possible mechanism for its effect in heart failure. *Circulation*. 1997; 96(5): 1386-9.
- Menezes CA, Rocha MO, Souza P E, Chaves AC, Gollob K J, Dutra W O. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol*. 2004; 137(1): 129-38.
- Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2001; 159 (5): 1723-33.
- Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda. Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN, 2004.

- Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, Uberaba, MG. *Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical* 2005; 38: 11-4.
- Morris SA, Tanowitz HB, Wittner M, Bilezikian JP. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation*. 1990 Dec;82(6):1900-9
- Mosca W, Plaja J, Hubsch R, Cedillos R. Longitudinal study of immune response in human Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 1985; 22(3): 438-41.
- Muller U, Kohler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, Di Santo GP, Brombacher F, Hölscher C. IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol*. 2001 Sep 15;167(6):3346-53.
- Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunobiologia de Janeway*. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- Neves DP, de Mello AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- Oliveira GC, Lopes LR, Andreollo NA, Neto JSC. O megaesôfago tratado cirurgicamente: perfil epidemiológico dos pacientes operados no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas entre 1989 e 2005. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2008; 41; 183-188.
- Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM et al. "The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group." *N Engl J Med*. 1996; 334 (21): 1349-55.
- Parker ER, Sethi A. Chagas disease: coming to a place near you. *Dermatol Clin*. 2011; 29(1): 53-62.
- Pissetti CW, Correia D, Braga TT, Faria GEL, Oliveira RF, Betânia Maria Ribeiro BM et al. Associação entre os níveis plasmáticos de TNF-D, IFN-J, IL-10, óxido nítrico e os isotipos de IgG específicos nas formas clínicas da doença de Chagas crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009; 42(4): 425-430.
- Pittella JEH. O processo de avaliação em ciência e a indicação de Carlos Chagas ao prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(1): 67-72.
- Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saúde Pública*. 2003; 37(1): 107-15.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A et al. "The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators." *N Engl J Med*. 1999; 341(10): 709-17.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases*. 2001; 1(2): 92-100.

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

Reis DD, Jones EM, Tostes S, Jr., Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*. 1993; 48(5): 637-44.

Rey L. *Parasitologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 161-178.

Ribeirao M, Pereira-Chiocola VL, Renia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol*. 2000; 22(1): 49-53.

Ribeiro ALP, Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 1998; 31(3): 301-314.

Schindler R, Dinarello CA, Koch, KM. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors suppress synthesis of tumour necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood cells. *Cytokine*. 1995;7: 526.

Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102 Suppl 1: 75-85.

Silveira AC. O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. História de uma iniciativa internacional. 1991/2001. In: SILVEIRA A. C., ARIAS A. R., SEGURA E., GUILLÉN G., RUSSOMANDO G., SCHENONE H., DIAS J. C. P., PADILLA J. V., LORCA M., SALVATELLA R. O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. História de uma iniciativa internacional. 1991/2001. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 2002, p. 15-42.

Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc*. 2001; 73 (4): 547-59.

Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, Coelho JS, Chaves AC, Gollob KJ et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun*. 2007; 75(4): 1886-94.

The SOLVD Investigators (1992). "Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions." *N Engl J Med*. 1992; 327 (10): 685-91.

Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol*. 1991; 146(10): 3626-32.

Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, 2005.

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

Ward LS, Guariento ME, Fernandes GA, Maciel RM. Serum cytokines in chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999; 32(3): 285-9.

WHO. Control of Chagas disease. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2002; 905(i-vi, 1-109, back cover.

World Health Organization. First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2011.

Zhao SP, Xie XM. Captopril inhibits the production of tumor necrosis factor- α by human mononuclear cells in patients with congestive heart failure. *Clin Chim Acta.* 2001; 304 (1-2): 85-90.