

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO
BIOMARCADORES NA EVOLUÇÃO DA CARDIOMIOPATIA
CHAGÁSICA

GABRIELA DA SILVA CRUZ

Salvador – Brasil
2014

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS COMO
BIOMARCADORES NA EVOLUÇÃO DA CARDIOMIOPATIA
CHAGÁSICA**

GABRIELA DA SILVA CRUZ

Orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Co-orientadora: Dra. Ana Luiza Dias Angelo

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Brasil
2014**

"Somos todos geniais. Mas se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em árvores, ele passará sua vida inteira acreditando ser estúpido."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me apoiaram durante o mestrado e contribuíram para a realização deste projeto, especialmente:

A Deus, pelo dom da vida e por sempre me iluminar e me dar forças;

A toda minha família, principalmente aos meus pais, Anete Dias e Evandro Cruz, pelo amor incondicional, carinho, compreensão, estímulo e apoio a todo o momento;

A minha melhor amiga, Maiara Almeida, por estar sempre ao meu lado, me ouvindo, me acalmando, me apoiando, me incentivando e me aturando nos momentos de surtos;

A minha orientadora, Dra. Milena Soares, pelos ensinamentos, orientação e confiança em mim depositada;

A minha co-orientadora, Dra. Ana Luiza Angelo, pela indescritível ajuda, dedicação, paciência e amizade;

Ao Dr. Ricardo Ribeiro por ter me recebido no laboratório e fornecido todo o suporte para o desenvolvimento deste trabalho;

À Dra. Ticiania Larocca por ter gentilmente cedido os pacientes para o estudo;

Ao Dr. Bruno Solano e ao Alexandre Schaer pelo grande auxílio com a parte clínica da pesquisa;

À Daniela Paixão por estar sempre disposta a ajudar com as amostras e os dados dos pacientes sem medir esforços ou dificuldades;

À Edlúcia Santos por colaborar com a coleta das amostras;

As queridas amigas Aline Thomaz, Carla Kaneto, Cristina Aragão, Helena da Hora, Lilian Silva e Sissi Carneiro por compartilhar comigo momentos bons e outros nem tanto e por me mostrar que eu nunca estava sozinha;

Ao amigo Vanderlei Reis pela ajuda, principalmente nas etapas finais da dissertação;

Aos colegas do CBTC pelo convívio diário;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela oportunidade de desenvolvimento deste projeto;

Ao Centro de Biotecnologia e Terapia Celular pela disponibilidade de estrutura física e material;

A CAPES pelo apoio financeiro;

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para esse trabalho.

CRUZ, Gabriela da Silva. Avaliação de polimorfismos genéticos como biomarcadores na evolução da cardiomiopatia chagásica 108 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é um parasita intracelular e agente causador da doença de Chagas, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Sabe-se que durante os processos de inflamação, regeneração e fibrose desencadeados pelo *T. cruzi* no hospedeiro há a participação de diversos mediadores e fatores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos com as formas clínicas e o grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas. Os polimorfismos foram analisados por PCR em tempo real. Foram incluídos no estudo 55 pacientes com diagnóstico de doença de Chagas e classificados de acordo com a forma clínica da doença, sendo que 17 apresentavam a forma indeterminada, 15 a forma cardíaca sem disfunção ventricular e 23 a forma cardíaca com disfunção ventricular. Os genótipos CA dos polimorfismos do gene *LGALS3* (rs4644 e rs4652); AG e GG do *SOCS3* (rs4969170); CT e TT do *IL-28B* (rs12979860 e 8099917, respectivamente); AG, AG, CC, AG e AG do *CLDN-1* (rs10212165, rs3909582, rs9865082, rs9880018 e rs9848283, respectivamente); e CC do *CCL5* (rs2280789) foram estatisticamente mais frequentes em pacientes com a forma cardíaca do que com a forma indeterminada da doença. Com relação ao grau de fibrose, os genótipos CC dos polimorfismos do gene *LGALS3* (rs4644 e rs4652); AA do *SOCS3* (rs4969170); CC do rs12979860 e TT do rs8099917 do *IL-28B*; AA do rs10212165, AA, AG e GG do rs3909582, CC e CT do rs9865082, AG e GG do rs9880018 e AA do rs9848283 do gene *CLDN1*; e CC do *CCL5* (rs2280789) foram estatisticamente mais frequentes em indivíduos com fibrose cardíaca <15% quando comparados com o grupo com fibrose ≥15%. Diante do exposto concluímos que os polimorfismos analisados podem ser úteis como futuros biomarcadores para estadiamento e conduta terapêutica em pacientes com doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Polimorfismo. Galectina 3. Proteínas Supressoras da Sinalização de Citocina. Interferon.

CRUZ, Gabriela da Silva. Evaluation of genetic polymorphisms as biomarkers in the evolution of Chagas cardiomyopathy. 108 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is an intracellular parasite and the agent that causes Chagas disease, which affects millions of people worldwide. Several factors and mediators are known to actively participate in the inflammation, fibrosis and tissue regeneration, which is triggered by *T. cruzi* within the host. The aim of this study was to evaluate the association of single nucleotide polymorphisms with clinical forms and rate of fibrosis in Chagas disease patients. The polymorphisms were analyzed by real-time PCR. The study consisted of 55 Chagas disease patients that were classified according to the clinical form of the disease, including 17 patients presenting the indeterminate form, 15 patients presenting the cardiac form without ventricular dysfunction and 23 patients presenting the cardiac form with ventricular dysfunction. The genotypes of CA of *LGALS3* gene polymorphisms (rs4644 and rs4652); AG and GG of *SOCS3* (rs4969170); CT and TT of *IL-28B* (rs12979860 and 8099917, respectively); AG, AG, CC, AG and AG of *CLDN-1* (rs10212165, rs3909582, rs9865082, rs9880018 and rs9848283, respectively); and CC of *CCL5* (rs2280789) were significantly more frequent in patients presenting the cardiac form compared to patients presenting the indeterminate form. Regarding the degree of fibrosis, the CC genotype of polymorphisms of the genes *LGALS3* (rs4644 and rs4652); AA of *SOCS3* (rs4969170); CC of rs12979860 and TT of rs8099917 of the *IL-28B*; AA of rs10212165 and AA, AG and GG of rs3909582, CC and CT of rs9865082, AG and GG of rs9880018 and AA of rs9848283 of the gene *CLDN1*; and CC of *CCL5* (rs2280789) were statistically more frequent in patients presenting <15% cardiac fibrosis when compared to patients presenting fibrosis ≥15%. Taken together, our results suggest that the polymorphisms analyzed may be useful biomarkers for therapeutic management of patients with Chagas disease.

Keywords: Chagas disease. Polymorphism. Galectin 3. Suppressor of Cytokine Signaling Proteins. Interferon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	20
Figura 2	Proteínas SOCS regulam a via de sinalização JAK-STAT	30
Figura 3	Ativação da via de sinalização JAK-STAT por IFN- λ s	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Polimorfismos dos genes estudados (<i>LGALS3</i> , <i>SOCS3</i> , <i>IL-28B</i> , <i>CLDN-1</i> e <i>CCL5</i>)	50
Tabela 2	Dados demográficos	51
Tabela 3	Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>LGALS3</i> e forma clínica em pacientes com doença de Chagas	52
Tabela 4	Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene <i>LGALS3</i> e forma clínica em pacientes com doença de Chagas	53
Tabela 5	Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>LGALS3</i> e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas	53
Tabela 6	Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene <i>LGALS3</i> e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas.	54
Tabela 7	Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>LGALS3</i> e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas.	54
Tabela 8	Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene <i>LGALS3</i> e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas	55
Tabela 9	Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene <i>SOCS3</i> e forma clínica em pacientes com doença de Chagas.	55
Tabela 10	Frequência dos alelos do polimorfismo do gene <i>SOCS3</i> e forma clínica em pacientes com doença de Chagas	56
Tabela 11	Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene <i>SOCS3</i> e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas	56
Tabela 12	Frequência dos alelos do polimorfismo do gene <i>SOCS3</i> e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas	57
Tabela 13	Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene <i>SOCS3</i> e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas	57
Tabela 14	Frequência dos alelos do polimorfismo do gene <i>SOCS3</i> e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas	57
Tabela 15	Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>IL-28B</i> e forma clínica em pacientes com doença de Chagas	58
Tabela 16	Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene <i>IL-28B</i> e forma clínica em pacientes com doença de Chagas	59
Tabela 17	Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>IL-28B</i> e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas	59
Tabela 18	Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene <i>IL-28B</i> e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas	60
Tabela 19	Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>IL-28B</i> e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas	60
Tabela 20	Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene <i>IL-28B</i> e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas	61
Tabela 21	Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>CLDN-1</i> e forma clínica em pacientes com doença de Chagas	62

Tabela 22	Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene <i>CLDN-1</i> e forma clínica em pacientes com doença de Chagas	63
Tabela 23	Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>CLDN-1</i> e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas	64
Tabela 24	Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene <i>CLDN-1</i> e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas	65
Tabela 25	Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene <i>CLDN-1</i> e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas	66
Tabela 26	Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene <i>CLDN-1</i> e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas	67
Tabela 27	Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene <i>CCL5</i> e forma clínica em pacientes com doença de Chagas	68
Tabela 28	Frequência dos alelos do polimorfismo do gene <i>CCL5</i> e forma clínica em pacientes com doença de Chagas	68
Tabela 29	Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene <i>CCL5</i> e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas	68
Tabela 30	Frequência dos alelos do polimorfismo do gene <i>CCL5</i> e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas	69
Tabela 31	Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene <i>CCL5</i> e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas	69
Tabela 32	Frequência dos alelos do polimorfismo do gene <i>CCL5</i> e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i>
CCDV	Forma cardíaca com disfunção ventricular
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i> (Ligante de quimiocina C-C)
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i> (Receptor de quimiocina C-C)
CD	Forma cardíaca
CLDN-1	Claudina-1
CMV	Citomegalovírus humano
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CRF2	<i>Class II cytokine receptor family</i> (Receptor de citocinas de classe II)
CSDV	Forma cardíaca sem disfunção ventricular
CT-1	Cardiotrofina-1
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i> (Ligante de quimiocina C-X-C)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EPO	Eritropoietina
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônia de granulócitos)
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> (Vírus da hepatite C)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus type 1</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão intercelular 1)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IND	Forma indeterminada
ISGs	<i>IFN stimulated gene</i> (Genes estimulados por IFN)
JAK	Proteína janus-cinases
LGALS3	<i>Lectin Galactoside-binding soluble 3</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> (Fator inibidor de leucemia)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
MIP1	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted</i> (Regulada após a ativação por células T normais expressadas e secretadas)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
rs	<i>Reference SNP</i>
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)

SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i> (Proteínas supressoras da sinalização de citocinas 3)
STAT	<i>Signal transducers and activator of transcription</i> (Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição)
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (Fator alpha de necrose tumoral)
UTR	<i>Untranscription region</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	DOENÇA DE CHAGAS	16
2.1.1	Histórico da doença de Chagas	16
2.1.2	Epidemiologia da doença de Chagas	17
2.1.3	Transmissão da doença de Chagas	18
2.1.5	Tratamentos disponíveis	21
2.1.6	Mediadores e a doença de Chagas	23
2.2	POLIMORFISMOS	24
2.2.1	Galectina-3	26
2.2.2	SOCS-3	29
2.2.3	IL-28B	33
2.2.4	Claudina-1	37
2.2.5	CCL5	40
3	OBJETIVOS	45
3.1	GERAL	45
3.2	ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	46
4.1.1	Desenho do estudo	46
4.1.2	Critérios de inclusão	46
4.1.3	Critérios de exclusão	47
4.2	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	47
4.2.1	Extração do ácido desoxirribonucléico (DNA)	47
4.2.2	Genotipagem dos polimorfismos	47
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5	RESULTADOS	50
5.1	SNPs DO GENE <i>LGALS3</i>	51
5.2	SNPs DO GENE <i>SOCS3</i>	54
5.3	SNPs DO GENE <i>IL-28B</i>	57
5.4	SNPs DO GENE <i>CLDN-1</i>	60
5.5	SNPs DO GENE <i>CCL5</i>	66
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	78

8	REFERÊNCIAS.....	79
9	ANEXO I.....	99

1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é um parasita intracelular e agente causador da doença de Chagas, afetando mais de oito milhões de pessoas, especialmente na América Latina, onde a doença é endêmica. Classicamente a infecção chagásica pode ser dividida em duas fases, aguda e crônica. A fase aguda apresenta curso clínico de curta duração e reações inflamatórias intensas nos tecidos parasitados. Na fase crônica os indivíduos podem permanecer assintomáticos ou desenvolver uma das formas sintomáticas da doença (forma cardíaca, digestiva ou mista).

Após a entrada do parasito no hospedeiro desenvolve-se uma fase aguda caracterizada por curso clínico de curta duração, intenso processo inflamatório e elevada parasitemia (COURA; DIAS, 2009). Em alguns casos, os pacientes desenvolvem sintomas clínicos como febre, apatia, edema nos membros inferiores ou na face, hepatoesplenomegalia, infarto ganglionar generalizada e taquicardia (PINTO et al., 2007). Após semanas ou meses os indivíduos evoluem para a fase crônica e a maioria permanece assintomático (RIBEIRO; ROCHA, 1998). Aproximadamente 30% dos pacientes cronicamente infectados evoluem para uma das formas clínicas sintomáticas: cardíaca, digestiva ou mista.

Ainda não são conhecidos os mecanismos envolvidos na determinação da forma clínica nos indivíduos infectados. Desconhece-se por que alguns pacientes permanecem assintomáticos por toda a vida e por que outros desenvolvem a forma mais grave da doença, a cardiomiopatia chagásica crônica, principal causa de morte em indivíduos portadores da doença. Além disso, os mecanismos imunopatológicos da infecção chagásica não estão completamente elucidados. Diante disso, é necessário novos estudos acerca dos mediadores envolvidos nesta doença, principalmente aqueles cujos dados na literatura são escassos ou inexistentes, como galectina-3, SOCS-3, IL-28B, claudina-1 e CCL5.

Os trabalhos sobre os marcadores genéticos têm crescido nos últimos anos. Pode-se atualmente conhecer a susceptibilidade genética para muitas doenças, como o câncer. Os biomarcadores têm sido largamente utilizados na prática clínica no manejo de muitas doenças complexas, como hepatite C, hemocromatose e alguns tipos de cânceres como o de ovário, mama, pulmão e pâncreas, facilitando o estabelecimento de terapia individualizada, segura e efetiva (DI MAGLIANO; LOGSDON, 2013; GE et al.,

2009; MARTIN et al., 2013; MAVADDAT et al., 2013; RATNER et al., 2012). Em relação à infecção chagásica ainda não há muitos trabalhos acerca do tema, apesar do suporte que estes estudos podem oferecer no tratamento de pacientes com a doença.

Alguns estudos avaliaram a susceptibilidade genética à doença de Chagas em humanos. Moléculas envolvidas no processo desencadeado pelo parasito no hospedeiro tiveram os seus polimorfismos estudados em pacientes com a doença, a exemplo da IL-4 (interleucina-4), da IL-6 (interleucina-6), da IL-10 (interleucina-10), da IL-12 (interleucina-12), do TNF- α (fator alpha de necrose tumoral) e do IFN- γ (interferon- γ), demonstrando, em alguns casos, associação entre o polimorfismo genético e o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica em pacientes com a doença na fase crônica (BERAÚN et al., 1998; COSTA et al., 2009; CRIADO et al., 2012; DRIGO et al., 2007; FLÓREZ et al., 2011; TORRES et al., 2010a; TORRES et al., 2010b; ZAFRA et al., 2007). Contudo, os estudos ainda são escassos e versam sobre um número restrito de mediadores, dificultando importantes inferências.

No presente trabalho buscam-se analisar os polimorfismos dos genes *galectina-3*, *SOCS-3*, *IL-28B*, *CLDN-1* e *CCL5* em pacientes com doença de Chagas correlacionando-os com as formas clínicas e os graus de fibrose nos indivíduos. Hipotetiza-se que, como estes mediadores estão envolvidos no processo desencadeado pelo *T. cruzi* no hospedeiro, a análise dos polimorfismos pode contribuir para o conhecimento de mecanismos ainda não elucidados na doença de Chagas. Além disso, este estudo pode fornecer suporte para o estabelecimento de novos biomarcadores na infecção pelo *T. cruzi*, contribuindo manejo clínico da doença, como acontece em alguns tipos de cânceres e hepatite.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

2.1.1 Histórico da doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pela infecção produzida pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Inicialmente restrita às Américas, essa antropozoonose espalhou-se por outros continentes e atualmente representa importante problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que existam aproximadamente 7-8 milhões de pessoas infectadas, especialmente na América Latina, onde a doença é endêmica (WHO, 2013). No Brasil estima-se que existem cerca de dois milhões de indivíduos infectados, com predomínio de casos crônicos devido principalmente à transmissão vetorial domiciliar ocorrida no passado e hoje interrompida (BRASIL, 2013). Nas últimas décadas houve mudança no perfil epidemiológico da doença devido aos movimentos migratórios, que proporcionaram a urbanização e globalização da doença (WHO, 2010).

Esta parasitose foi descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909. Dois anos antes, durante a investigação de um suposto surto de malária em Minas Gerais, Carlos Chagas identificou uma nova espécie de parasito que foi então denominada *Schyzotrypanum cruzi* e seu vetor, um triatomíneo popularmente denominado “barbeiro”. Posteriormente este parasito foi renomeado *Trypanosoma cruzi*, causador de uma moléstia infecciosa (CHAGAS, 1909; LARANJA; DIAS; NOBREGA, 1948).

Embora a doença de Chagas tenha sido descrita pela primeira vez há mais de 100 anos, dados recentes revelaram a presença de DNA de *T. cruzi* em múmias colombianas de cerca de nove mil anos de idade, evidenciando que essa doença afeta a população humana há milhares de anos (ARAÚJO et al., 2009). Em decorrência de migrações populacionais, a doença de Chagas, classicamente considerada como uma enfermidade rural, passou a atingir centros urbanos e atualmente milhões de indivíduos estão infectados em todo o mundo (COSTA; LORENZO, 2009).

Originalmente a doença de Chagas era uma enzootia de animais silvestres, na qual mais de 100 espécies de marsupiais, quirópteros, roedores, edentados, carnívoros, lagomorfos

e primatas abrigavam o *T. cruzi*. Por outro lado, várias espécies de triatomíneos silvestres se encarregavam de transmitir o parasito entre eles, criando um ciclo silvestre da infecção (COURA, 2003). A chegada dos seres humanos na América e o conseqüente aumento das atividades agrícolas e da domesticação de animais proporcionaram a transmissão acidental de *T. cruzi* em humanos, e a doença de Chagas, por milhares de anos, passou a ser considerada uma antropozoonose (COURA; VIÑAS, 2010).

Nos últimos 200-300 anos, como resultado do desmatamento provocado pela expansão da agricultura e agropecuária, além da abertura de vias terrestres de transporte, os insetos silvestres se adaptaram ao ambiente doméstico na procura de nova fonte alimentar, a exemplo do sangue de seres humanos e de animais domésticos. Deste modo, um novo ciclo de infecção foi estabelecido e a doença de Chagas passou a ser classificada como uma zoonose, isto é, uma doença que se transmite entre animais e seres humanos endemicamente (ZINGALES, 2011).

2.1.2 Epidemiologia da doença de Chagas

De acordo com dados da OMS existem aproximadamente oito milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença de Chagas é endêmica. Estima-se que mais de 25 milhões de pessoas estão em risco de doença e que, em 2008, esta doença tenha matado mais de 10.000 pessoas (WHO, 2013).

Atualmente no Brasil predominam os casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados. No entanto, nos últimos anos, a ocorrência de doença de Chagas aguda tem sido observada principalmente nos estados da Amazônia Legal, com casos isolados em outros estados. No período de 2000 a 2011, foram registrados no Brasil 1.252 casos de doença de Chagas aguda. Destes, 70% (877/1.252) foram por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial (92/1.252), e em 22% (276/1.252) dos casos não foi identificada a forma de transmissão (BRASIL, 2013).

Em junho de 2006, o Brasil recebeu da OMS o certificado de eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo vetor silvestre *Triatoma infestans* (ANDRADE et al., 2011). Isso demonstra o quanto o país tem avançado com medidas para a

erradicação da doença. A redução na transmissão confirma-se comparando dados de 1975-1985 com aproximadamente 4.500.000 de indivíduos infectados e, 30 anos mais tarde, em 2005, com 1.900.000 estimados (SCHMUNIS, 2007).

Caracteristicamente rural, a doença de Chagas tradicionalmente atinge indivíduos que habitam ou habitaram "casas de pau-a-pique", comuns nas regiões do sertão brasileiro, nas quais o vetor pode se alojar e colonizar facilmente (DIAS, 2007). A urbanização da população rural na América Latina fez com que a doença de Chagas se tornasse um importante problema de saúde pública. O fluxo migratório de latino-americanos para outros países foi decisivo para que o número de pessoas infectadas aumentasse em muitas localidades. Os Estados Unidos, por exemplo, já contabilizam mais de cem mil pacientes portadores da doença. Além disso, outros casos detectados de infecção por *T. cruzi* foram associados a transfusões de sangue e transplantes de órgãos nos Estados Unidos, Canadá e países da Europa, onde a triagem para detectar a doença de Chagas em doadores não era realizada até muito recentemente (MAGUIRE, 2006).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada N° 57 (BRASIL, 2010) a realização de teste para detecção de anticorpo anti-*T. cruzi* é obrigatória em cada doação de sangue. Atualmente os bancos de sangue estão controlados no Brasil e em muitos outros países da América Latina. Entretanto, o sangue infectado ainda é um grande problema na Bolívia, onde, em cidades como Santa Cruz de la Sierra e Cochabamba, estima-se que a metade de doadores de sangue pode estar infectada com o *T. cruzi* (COURA; VIÑAS, 2010).

2.1.3 Transmissão da doença de Chagas

A maioria das infecções pelo *T. cruzi* é adquirida através da transmissão vetorial. Outros modos de transmissão incluem a transfusão de hemoderivados contaminados, transplante de órgãos, transmissão congênita, acidentes de laboratório e transmissão oral (COURA, 2007; MACHADO et al., 2012).

Casos de contaminação aguda decorrentes da ingestão acidental de parasitos em alimentos têm sido registrados em diversas localidades. No Brasil foram documentados casos de transmissão do *T. cruzi* decorrentes do consumo de açaí contaminado nos estados do Pará, Acre, Amapá e Amazonas (MONCAYO; SILVEIRA, 2009). Também foram registrados casos agudos da doença relacionados com a ingestão de caldo de cana

contaminado com o parasito em estados como Bahia, Paraíba e Santa Catarina (BASTOS et al., 2010; SHIKANAI-YASUDA et al., 1991; STEINDEL et al., 2008). Na Venezuela, em 2007, ocorreu um surto da doença de Chagas aguda em uma escola devido ao consumo de suco de goiaba contaminado. Neste episódio, 103 pessoas foram infectadas, 75% apresentaram sintomatologia para doença na fase aguda e uma criança foi a óbito (ALARCÓN DE NOYA et al., 2010).

O ciclo de vida do *T. cruzi* está representado na figura 1. Nele, o homem se infecta durante o repasto sanguíneo do barbeiro, que elimina as formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes. Essas formas infectantes penetram pela picada na pele ou pelas mucosas do hospedeiro vertebrado, invadem diferentes tipos celulares, a exemplo dos macrófagos, esplenócitos, hepatócitos e cardiomiócitos, diferenciando-se em formas amastigotas. Estas se multiplicam até que a célula fique repleta de amastigotas, que então se transformam em tripomastigotas. Quando a célula-alvo rompe, libera os tripomastigotas, que infectam novas células e se disseminam no organismo. Em um novo repasto sanguíneo, o triatomíneo se infecta, alimentando-se do sangue que contém tripomastigotas de um mamífero infectado. Dentro do inseto, o parasito se diferencia em epimastigotas e se replica no intestino do vetor por divisão binária, sendo, portanto, responsáveis pela manutenção da infecção no vetor. Antes de emergir em suas fezes a forma epimastigota se diferencia em tripomastigota metacíclico (BRENER, 1997; GARCIA; AZAMBUJA, 1991).

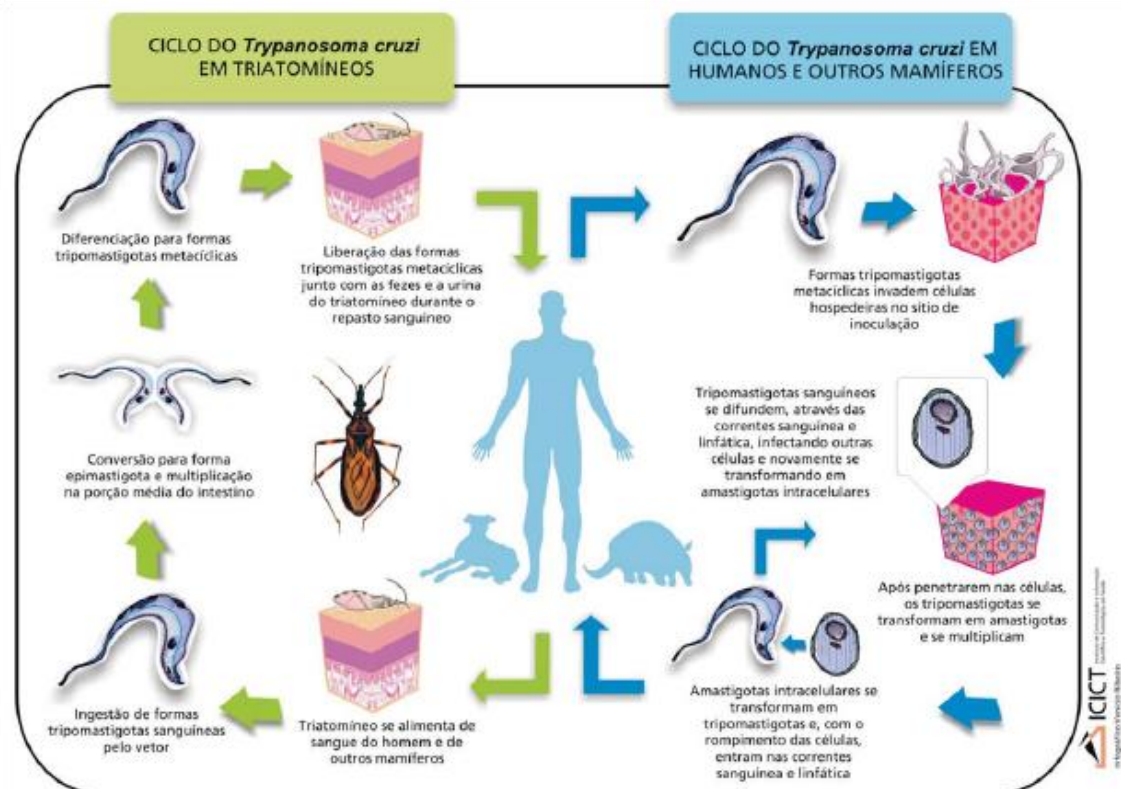


Figura 1 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Infográfico; Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

Os indivíduos infectados podem permanecer assintomáticos por muitos anos, na chamada forma indeterminada da doença. Esta forma é caracterizada pela positividade sorológica e/ou parasitológica para doença de Chagas, ausência de sintomatologia clínica, eletrocardiograma convencional normal e coração, esôfago e cólon radiologicamente normais (RIBEIRO; ROCHA, 1998). Em 20-30% dos casos os pacientes infectados evoluem para uma das formas sintomáticas da doença crônica (forma cardíaca, digestiva ou mista). Na forma digestiva é comum a presença de megaesôfago e megacólon, ou seja, aumento exagerado do esôfago ou cólon por contração dos esfíncteres correspondentes (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005). Já na forma cardíaca os pacientes podem apresentar comprometimento cardíaco e desenvolver, em graus clínicos variados, a cardiomiopatia chagásica crônica, principal causa de morte em indivíduos com doença de Chagas (DIAS; COURA, 1997). Na forma mista o paciente apresenta tanto comprometimento cardíaco quanto digestivo.

O dano cardíaco decorre de alterações fundamentais (inflamação, necrose e fibrose) que o parasito provoca, direta ou indiretamente, no tecido especializado de condução, no miocárdio contrátil e no sistema nervoso intramural (HIGUCHI et al.,

2003). Quando o coração é o órgão afetado, duas condições clínicas podem ser delimitadas: a forma cardíaca sem disfunção ventricular e a forma cardíaca com disfunção ventricular, uma vez que o principal marcador prognóstico é a existência ou não da referida disfunção. No primeiro caso, quando não há comprometimento ventricular, o paciente apresenta apenas arritmias e distúrbios de condução intraventricular e atrioventricular, com função ventricular normal. Já na forma cardíaca com disfunção ventricular, o quadro clínico depende da expressão de três distúrbios frequentemente coexistentes: insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo (ANDRADE et al., 2011).

2.1.5 Tratamentos disponíveis

O tratamento da doença de Chagas envolve tanto a terapia específica contra o parasita quanto a terapia adjuvante para o manejo das manifestações clínicas (BERN, 2011). Atualmente existem dois medicamentos disponíveis: nifurtimox e benzonidazol, sendo que no Brasil apenas o benzonidazol é dispensável (JANNINI; VILLA, 2007) Estes foram introduzidos na clínica há mais de 40 anos, apresentam eficácia variável e os pacientes podem experimentar graves efeitos colaterais (COURA, 2003).

Os efeitos colaterais mais comuns associados ao nifurtimox incluem anorexia, náuseas e vômitos e, menos comumente, os pacientes se queixam de alterações de humor, insônia e mialgia. Além disso, em alguns casos pode ocorrer insuficiência renal e hepática, além de convulsões e outros distúrbios do sistema nervoso (CLAYTON, 2010). Em relação ao benzonidazol os efeitos colaterais incluem manifestações de hipersensibilidade, depressão da medula óssea, polineuropatia periférica e anorexia (MACHADO et al., 2012).

O tratamento é consensual nos casos de infecção na fase aguda, na fase crônica em crianças, contaminação acidental e agudização de paciente crônico. Contudo, não há consenso para o tratamento na fase crônica tardia e forma indeterminada em indivíduos jovens (ANDRADE, 2011). Em pacientes com comprometimento cardíaco a indicação para o tratamento parasiticida permanece controversa. Para determinar a eficácia do tratamento com benzonidazol na fase crônica, está em andamento um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, que visa avaliar a evolução clínica por cinco anos de 3.000 pacientes com cardiomiopatia chagásica

crônica tratados com o benzonidazol: o estudo BENEFIT (The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis) (MARIN-NETO et al., 2008).

Acredita-se que a cura parasitológica pode ocorrer em 60-85% das pessoas com infecção aguda que completarem um ciclo inteiro dos medicamentos. A taxa de cura em crianças infectadas congenitamente pode ser superior a 90% se o tratamento for dado durante o primeiro ano de vida (GUEDES et al., 2012). Em geral, a taxa de cura em pacientes com doença de Chagas aguda parece diminuir em função do tempo entre a infecção e início do tratamento farmacológico. Em relação à infecção crônica, apesar de a terapia ser controversa, há cada vez mais evidências sugerindo que o tratamento dos pacientes pode ajudar a reduzir a progressão da doença.

Em um trabalho pioneiro, Garcia e cols. (2005) demonstraram que o tratamento com benzonidazol causa redução na disfunção cardíaca e na miocardite em camundongos chagásicos crônicos. Sabe-se ainda que a terapia com benzonidazol e nifortimox reduz o número de parasitos, as evoluções clínicas e eletrocardiográficas relacionadas à cardiomiopatia chagásica e impede a evolução da doença, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes (ANDRADE et al., 1991; GUEDES et al., 2012; VIOTTI et al., 2006).

São escassos os dados na literatura que demonstram a eficácia do tratamento, em especial na fase crônica, provavelmente devido às dificuldades com o tempo de seguimento ou com o tempo de infecção do paciente. Não foram conduzidos estudos definitivos avaliando o efeito do tratamento parasiticida sobre a história natural da doença e o contexto de incerteza é agravado pela ausência de exames que assegurem a total erradicação do parasito e confirmem a cura da enfermidade. Somado a isso, a deficiência no sistema de saúde de muitas comunidades rurais e carentes, em países endêmicos, também contribui para a insuficiência de dados sobre o assunto.

Além do tratamento antiparasitário, novas alternativas terapêuticas têm sido testadas em modelos animais e em ensaios clínicos com o objetivo de controlar os sinais e os sintomas da doença, principalmente em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica, a forma mais grave da doença de Chagas. O tratamento com o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) reduz a inflamação e a fibrose cardíaca em camundongos chagásicos crônicos em comparação aos animais não tratados (MACAMBIRA et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2013). Também foi visto que esta terapia reduz a expressão dos marcadores inflamatórios *sindecana-4*, *ICAM-1* (molécula

de adesão intercelular 1) e *galectina-3* nos corações dos animais cronicamente infectados com *T. cruzi* (VASCONCELOS et al., 2013)

A terapia celular também parece ser uma alternativa promissora na doença de Chagas. Ensaio pré-clínicos demonstraram que a administração de células mononucleares de medula óssea melhora a função cardíaca, reduzindo a inflamação e a fibrose, enquanto que, em pacientes com cardiomiopatia chagásica, foi visto que esta terapia promove melhora funcional pós-transplante, sem provocar efeitos adversos (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2012; SOARES et al., 2004; VILAS-BOAS et al., 2011). No entanto, um estudo multicêntrico, randomizado, placebo controlado, não demonstrou benefícios da terapia celular no grupo que recebeu a terapia com células mononucleares de medula óssea, quando comparados com o grupo que recebeu apenas o tratamento medicamentoso (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2012).

2.1.6 Mediadores e a doença de Chagas

O manejo dos pacientes infectados pelo *T. cruzi* deve buscar não apenas a cura parasitológica, mas também controlar os diversos processos celulares desencadeados pelo parasito no hospedeiro. Em 2010, Soares e cols. observaram que, em camundongos chagásicos crônicos, há vários fatores e moléculas com expressão alterada no coração, em comparação com o de animais não infectados. Foi observado aumento na expressão de diversos genes, entre eles os que codificam moléculas de adesão como *galectina-3*, *LGALS3* (do inglês, *Lectin Galactoside-binding soluble 3*), e importantes quimiocinas, além do principal receptor da quimiocina *CCL5* (ligante de quimiocina C-C 5), *CCR5* (receptor de quimiocina C-C 5), em animais cronicamente infectados. Esses dados sugerem que estas moléculas podem atuar como importantes indicadores da doença de Chagas.

Os mediadores que afetam a homeostase cardíaca também podem estar relacionados à infecção chagásica, principalmente na fase cardíaca crônica da doença. Sabe-se que a via de sinalização JAK-STAT (Janus cinase-transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição) tem papéis cardioprotetores por meio da inibição da apoptose, do dano mitocondrial e estresse oxidativo, anti-inflamação e angiogênese e que moléculas que agem nessa via, tais como a *SOCS3* (proteína supressora da sinalização de citocinas 3) e a *IL-28B* (interleucina-28B), podem interferir nestes processos.

Proteínas que afetam a secreção de citocinas ou cuja expressão é afetada em ambientes inflamatórios, como a CLDN-1 (claudina-1) e IL-28B também podem ser úteis como biomarcadores na doença de Chagas (PRASAD et al., 2005; TEDELIND et al., 2003).

Neste trabalho visamos analisar os polimorfismos dos genes *galectina-3*, *SOCS-3*, *IL-28B*, *CLDN-1* e *CCL5* em pacientes com doença de Chagas. A análise desses marcadores poderá contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese da doença, ainda não completamente elucidados. Essas moléculas, por estarem envolvidas direta ou indiretamente com o processo desencadeado no hospedeiro pelo parasito, podem contribuir para etapas importantes ainda não descritas na literatura. Além disso, busca-se fornecer suporte para o estabelecimento de novos biomarcadores na infecção pelo *T. cruzi*, o que pode auxiliar no manejo clínico da doença, como acontece em alguns tipos de cânceres e hepatite.

2.2 POLIMORFISMOS

Progressos substanciais têm sido feitos na área de genética humana, especialmente em farmacogenômica e, mais de uma década após a publicação da sequência do genoma humano, novos avanços na área permitiram, entre outros aspectos, a redução dos custos de genotipagem, maior celeridade dos processos e a realização de experimentos em larga escala (ESTRABAUD et al., 2012; LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001). Com esse avanço, ampliou-se o número de trabalhos acerca do estudo das variações das sequências do DNA, isto é, a compreensão de polimorfismos de DNA humano, com impactos nas pesquisas de genética de populações, doenças hereditárias, doenças multifatoriais, desenvolvimento de drogas, entre outros (BROOKES, 1999).

Os polimorfismos surgem como resultados de mutações no genoma. Tecnicamente um locus polimórfico apresenta dois ou mais alelos e a variação menos comum em um alelo polimórfico ocorre com frequência igual ou superior a 1% na população em geral (SCHORK; FALLIN; LANCHBURY, 2000). Os diferentes tipos de polimorfismo são tipicamente referidos pelo tipo de mutação que os criou. O tipo mais simples de polimorfismo resulta a partir da mutação de única base, a qual substitui um nucleotídeo por outro. Esse é denominado polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)

(NAVRATILOVA, 2006). A localização e a identificação dos SNPs é feita a partir do número do rs (do inglês, *reference SNP*).

A existência de SNPs pode aumentar ou diminuir a atividade de transcrição se este polimorfismo estiver localizado na região reguladora do gene. As substituições de nucleotídeos ou inserções / eliminações na codificação de sequências de genes podem causar mudanças qualitativas de proteínas. Nesse sentido, diversos polimorfismos nos genes que codificam proteínas importantes na patogênese de determinadas doenças têm sido associadas com resposta ao tratamento e/ou susceptibilidade, progressão ou gravidade de doenças, contribuindo para mudanças genótípicas na população (NAVRATILOVA, 2006).

Variações na sequência de DNA podem ser responsáveis pela evolução do genoma. Com base nessas observações, foi proposto que, catalogando os polimorfismos de DNA em diferentes populações e espécies, pode ser possível, entre outras coisas, compreender os processos evolutivos, conhecer a susceptibilidade de alguns indivíduos para muitas doenças comuns e permitir a individualização da terapia medicamentosa a fim de obter resultados mais satisfatórios (SHASTRY, 2007).

Estudos anteriores avaliaram a susceptibilidade genética à doença de Chagas em humanos. Importantes citocinas envolvidas no processo inflamatório desencadeado pelo parasito, tais como o TNF- α (fator alpha de necrose tumoral), o IFN- γ (interferon- γ), a IL-6 (interleucina-6), a IL-10 (interleucina-10) e a IL-4 (interleucina-4), tiveram os seus polimorfismos estudados em pacientes, demonstrando, em alguns casos, associação entre o polimorfismo genético e o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica em pacientes com a doença crônica (BERAÚN et al., 1998; COSTA et al., 2009; CRIADO et al., 2012; DRIGO et al., 2007; FLÓREZ et al., 2011; TORRES et al., 2010a; TORRES et al., 2010b).

Neste contexto, o presente trabalho visa avaliar se há associações entre polimorfismos genéticos de galectina-3, CCL5, SOCS3, CLDN-1 e IFN- γ com diferentes formas da doença (forma indeterminada, forma cardíaca sem disfunção ventricular e forma cardíaca com disfunção ventricular) em pacientes com doença de Chagas na fase crônica, visando a sua possível utilização como biomarcadores na evolução da cardiopatia chagásica.

2.2.1 Galectina-3

As galectinas são uma família de proteínas de ligação a β -galactosídeos, cuja característica comum é a presença de pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidratos com afinidade para β -galactosídeos (BARONDES et al., 1994). De acordo com o número e organização desses domínios os membros da família das galectinas são classificados em três subgrupos: grupo protótipo, grupo de repetição em tandem e grupo quimera (HIRABAYASHI; KASAI, 1993). Os membros do grupo protótipo contém apenas um desses domínios (galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15), o segundo grupo contém dois domínios homólogos (galectinas 4, 6, 8, 9 e 12), enquanto que a galectina-3, único membro do grupo quimera, tem um domínio de ligação a carboidrato ligado a uma região N-terminal rica em prolina, glicina ou tirosina (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006; HENDERSON; SETHI, 2009; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008).

As galectinas estão localizadas principalmente no citoplasma, mas em alguns casos podem ser identificadas no núcleo, na superfície celular e no espaço extracelular (ELOLA et al., 2007; DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). Elas são expressas em diferentes tipos celulares e tecidos e parecem estar envolvidas em muitos processos biológicos, tais como embriogênese, adesão e proliferação celular, apoptose, *splicing* do RNA mensageiro, colonização bacteriana e modulação da resposta imune (HUGHES, 2001; LIU; PATTERSON; WANG, 2002; RABINOVICH et al., 1999; RABINOVICH et al., 2002). Além disso, essas proteínas exercem papéis importantes em vários processos patológicos como doenças autoimunes, reações alérgicas, inflamação, aterosclerose e complicações do diabetes (WADA; MAKINO, 2001).

O membro mais estudado da família das galectinas é a galectina-3, uma proteína de 29 a 35-kDa que está envolvida em diversos processos biológicos. A estrutura do gene da galectina-3, *LGALS3* (do inglês, *Lectin Galactoside-binding soluble 3*), é consistente com a organização multi-domínio da proteína. O gene é composto por 6 exões e 5 íntrons e em humanos está localizado no cromossomo 14, locus q21–q22 (KRZEŚLAK; LIPÍŃSKA, 2004; RAIMOND et al., 1997).

O gene da galectina-3 é polimórfico em populações humanas. No presente estudo foram avaliados dois polimorfismos neste gene, o rs4644 e o rs4652. Ambos envolvem a substituição de nucleotídeos na região exônica do gene, gerando a troca de aminoácidos de classes diferentes e, dessa forma, a ocorrência de mutações não-sinônimas. Para o rs4644 a substituição de uma citocina por uma adenina resulta na

troca do aminoácido prolina por histidina. Já para o rs4652 a substituição de uma adenina por uma citosina envolve a troca do aminoácido treonina por prolina.

Sabe-se que um polimorfismo do gene *LGALS3*, o rs4644, influencia a susceptibilidade dessa proteína à clivagem por metaloproteinases da matriz (NANGIA-MAKKER et al., 2007). Esse polimorfismo foi estudado em amostras de pacientes com câncer de mama e o alelo mutante A esteve associado com o aumento nos níveis de galectina e com o risco de desenvolvimento de câncer de mama em pacientes caucasianos e asiáticos (BALAN et al., 2008). Em 2012, Trompet e cols. demonstraram que para os polimorfismos rs4644 e rs4652 os alelos mutantes A e C, respectivamente, tiveram associação com o aumento nos níveis de galectina e a piora na função cognitiva em pacientes idosos.

A galectina-3 é expressa em macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos (HUGHES, 1999). Nos tecidos, essa proteína é abundante no pulmão, baço, estômago, glândulas adrenais, útero e ovário. A galectina-3 também é expressa em níveis baixos no rim, coração, cérebro, pâncreas e fígado (KIM et al., 2007). O aumento nos níveis de galectina-3 está associado a várias doenças como câncer, desordens imunológicas e comprometimento cardiovascular (BOER, 2011; CALIFICE; CASTRONOVO; VAN DEN BRULE, 2004; DHIRAPONG et al., 2009).

Em um modelo murino de hipertensão grave observou-se que havia diferença na regulação de 48 genes, entre eles *LGALS3*, que estava cinco vezes mais expresso nos corações descompensados do que nos corações normais (SCHROEN et al., 2004; SHARMA et al., 2004). Este estudo também avaliou biópsias ventriculares de pacientes com esteatose aórtica com fração de ejeção preservada ou reduzida e verificou que os níveis de galectina-3 estavam mais elevados em biópsias de pacientes com fração de ejeção reduzida, demonstrando a associação dessa proteína com a piora do quadro clínico em pacientes cardíacos.

Em 2006, Van Kimmenade e cols. demonstraram que pacientes com insuficiência cardíaca apresentaram níveis de galectina-3 mais elevados do que os pacientes sem a doença (médias 9.2 ng/mL e 6.9 ng/mL, respectivamente, $p < 0.001$). Atualmente a mensuração dos níveis dessa proteína pode ser utilizada no manejo de pacientes com insuficiência cardíaca crônica (MCCULLOUGH et al., 2002). Indivíduos com concentração $>25,9$ ng/mL de galectina-3 apresentam maior risco de hospitalização (28%) e morte ao longo de 18 meses (43%) (MCCULLOUGH; OLOBATOKE, VANHECKE, 2011).

A secreção da galectina-3 está associada com a ativação de macrófagos e fibroblastos, os quais levam à inflamação e à fibrose. Já foi descrito que a galectina-3 é produzida por macrófagos e miofibroblastos ativados em modelos experimentais de fibrose cardíaca, renal e hepática (HENDERSON et al., 2006; HENDERSON et al., 2008; SHARMA et al., 2004). Essa molécula contribui para a capacidade fagocítica dos macrófagos através de mecanismos intracelulares (SANO et al., 2003). Oliveira e cols. (2011) comprovaram a associação entre a expressão de galectina-3 e o desenvolvimento de fibrose em modelo de cirrose hepática. Além disso, a infusão desta proteína em fibroblastos cardíacos normais *in vivo* resultou em aumento na proliferação dessas células e na produção de colágeno (SHARMA et al., 2004).

Intenso processo inflamatório e fibrose também são condições características da cardiopatia chagásica crônica, uma cardiomiopatia de natureza inflamatória caracterizada por anormalidades da condução cardíaca, arritmias e insuficiência cardíaca congestiva (MACEDO et al., 1982 apud TEIXEIRA et al., 2012; PRATA, 2001). O dano cardíaco pode ser decorrente da persistência do *T. cruzi* nas lesões ou de reações autoimunes, relacionadas à perda de tolerância a antígenos próprios ou formação de anticorpos anti-parasitas com reação cruzada a componentes do hospedeiro (COSSIO et 1974; OLIVARES-VILLAGÓMEZ et al., 1998; RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 1992; SOARES; PONTES-DE-CARVALHO; RIBEIRO-DOS-SANTOS, 2001).

Soares e cols. (2010) demonstraram a elevação na expressão de diversos marcadores, entre eles a galectina-3, nos corações de camundongos chagásicos crônicos. O tratamento com células da medula óssea reduziu a expressão de galectina-3, a inflamação e a fibrose em modelo de cardiomiopatia chagásica crônica (SOARES et al., 2011). Em outro trabalho do mesmo grupo foi visto que o tratamento com G-CSF em modelo de cardiomiopatia chagásica crônica reduz a inflamação, a fibrose e a expressão de galectina-3 em células inflamatórias (VASCONCELOS et al., 2013).

Sabe-se que a galectina-3 atua ainda na interação parasito-hospedeiro. As mucinas são as principais glicoproteínas de superfície do *T. cruzi* e os seus resíduos de açúcar estão envolvidos com a invasão de células de mamíferos pelas formas tripomastigotas do parasito (VILLALTA; KIERSZENBAUM 1984; YOSHIDA et al. 1989). Moody, Ochieng e Villalta (2000) demonstraram que a galectina-3 faz a ligação entre as mucinas do parasito e laminina da matriz extracelular de mamíferos, promovendo a fixação e a entrada do *T. cruzi* nas células. A expressão de galectina-3 em células musculares lisas das artérias coronárias humanas é necessária para a adesão

do *T. cruzi* nestas células e o silenciamento da expressão de galectina-3 reduz significativamente a adesão de tripomastigotas às células (KLESHCHENKO et al. 2004). Além disso, já foi descrito que galectina-3 é expressa em células B de camundongos infectados com *T. cruzi* e tem a sua expressão elevada após infecção pelo parasito (ACOSTA-RODRÍGUEZ et al., 2004; VRAY et al., 2004).

2.2.2 SOCS-3

As citocinas são proteínas secretadas por vários tipos celulares para promover a sinalização célula-célula. Esta sinalização é iniciada através da interação entre o ligante com receptores transmembrana específicos (CROKER; KIU; NICHOLSON, 2008). As citocinas regulam diversos processos biológicos, tais como o controle das respostas imunes, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (O'SHEA; MURRAY, 2008; SIEBERT; WALKER, 2010). A resposta celular à estimulação por uma citocina depende do tipo de citocina e da natureza da célula-alvo (NICOLA, 1994).

Diversas citocinas, incluindo as interleucinas (IL), os interferons (IFNs) e os fatores de crescimento hematopoiéticos, ativam as vias de transdução JAK-STAT (Janus cinase-transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição) (IHLE, 2011; STARK; DARNELL, 2012). A ligação de uma citocina a esses receptores de superfície celular altera a sua conformação, causando a aproximação de duas JAKs para que possam fazer transfosforilação, aumentando, assim, a atividade de seus domínios de tirosina-cinase. As JAKs, então, fosforilam as tirosinas dos receptores de citocinas, criando sítios para a ancoragem de proteínas de sinalização com sítios SH2, incluindo as STATs. Estas últimas são fosforiladas por JAKs e depois dimerizam, deixam o receptor e translocam para o núcleo, onde elas ativam a transcrição gênica (Figura 2) (IHLE, 2011; YASUKAWA et al., 2012).

A via JAK-STAT pode ser regulada negativamente em várias etapas por mecanismos distintos (YASUKAWA; SASAKI; YOSHIMURA, 2000; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007). A família das proteínas supressoras da sinalização das citocinas (SOCS) fornece um dos principais mecanismos de regulação da sinalização de citocinas (ALEXANDER; HILTON, 2004; YOSHIMURA et al., 2007). É importante ressaltar que os genes que codificam as proteínas SOCS são alvos diretos de proteínas STAT; as cascatas de JAK-STAT, assim, controlam a sua própria sinalização por *feedback*. A

regulação por *feedback* negativo das proteínas SOCS controla a duração e a intensidade das vias das citocinas induzidas por JAK-STAT (Figura 2).

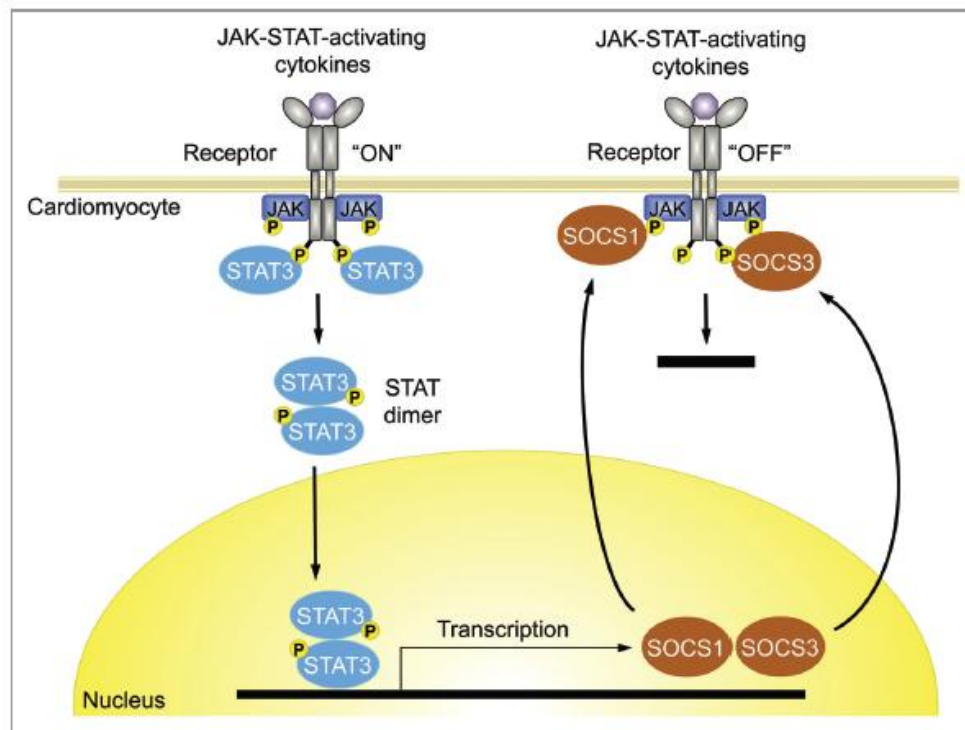


Figura 2. As proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS) regulam as vias de transdução Janus cinases-proteínas reguladoras gênicas (JAK-STAT). A ativação das JAKs fosforila o receptor de citocinas, levando ao recrutamento e a ativação das proteínas STATs. Estas, por sua vez, translocam para o núcleo e ativam a transcrição gênica, incluindo dos genes SOCS. As proteínas SOCS se ligam ao JAK para inibir por *feedback* negativo a sua atividade cinase e consequentemente a transcrição de genes dependentes desta via.

Fonte: Yasukawa et al., 2012.

Embora descritas inicialmente como inibidores da sinalização das citocinas, as proteínas SOCS podem ser induzidas através da ativação da via JAK-STAT por vários hormônios, como leptina, insulina, hormônio de crescimento, prolactina, entre outros, e, quando expressas, inibem a sinalização e a atividade biológica de seus indutores (BJORBAEK et al., 1998; EMILSSON et al., 1999; FAVRE et al., 1999; HELMAN et al., 1998; PEZET et al., 1999; SADOWSKI et al., 2001; TOLLET-EGNELL et al., 1999).

Apesar de existirem oito proteínas SOCS (SOCS 1-7 e proteínas SH2 induzidas pela citocina (CIS)), as evidências genéticas de camundongos e células sem SOCS1 e SOCS3 mostram que essas duas proteínas SOCS são necessárias para reduzir a produção global de sinalização de seus receptores alvos (ALEXANDER; HILTON, 2004; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007). A modulação mediada por SOCS1 e

SOCS3 na sinalização de receptores de citocinas, portanto, tem efeitos profundos sobre a regulação da imunidade e inflamação afetando a ativação, o desenvolvimento e as funções homeostáticas de todas as linhagens envolvidas na resposta imunológica e inflamatória.

A SOCS3 é uma proteína que inibe fortemente a atividade cinase de JAK. A SOCS3 é induzida por uma variedade de citocinas ativadoras JAK-STAT, incluindo a IL-6, o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), a eritropoietina (EPO), a cardiotrofina-1 (CT-1) e o fator inibidor de leucemia (LIF) (MARINE et al., 1999; ROBERTS et al., 2001). Estudos anteriores identificaram o RNA mensageiro de SOCS3 em diversos tecidos e células como timo, pulmão, baço, fígado, macrófagos, células endoteliais e da linhagem mielóide (ISOMAKI et al., 2007; RAKSHIT et al., 2006; WHITE et al., 2011).

O gene *SOCS3* está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q25) e consiste em um único éxon com 850 nucleotídeos. As sequências 3' UTR (do inglês, *untranscription region*) e do promotor deste gene são regiões ricas em nucleotídeos G (guanina) e C (citosina) (GYLVIN et al., 2004).

Os polimorfismos do gene *SOCS3* foram estudados para algumas doenças. Em pacientes com hepatite C crônica, para o rs4969170 do gene *SOCS3* houve associação protetora entre o genótipo GG e a resposta virológica sustentada (ANGELO et al., 2013). Zheng e cols. (2013) em um estudo com 290 pacientes demonstraram que a frequência do genótipo AA e do alelo A do polimorfismo do *SOCS3* rs4969170 estiveram associados com a resistência à insulina em pacientes com hepatite C crônica. Neste estudo, o genótipo AA esteve associado também com o aumento na expressão de RNA mensageiro de *SOCS3*.

As moléculas SOCS parecem ter importância crucial na homeostase cardíaca. Elas podem regular a ativação de macrófagos e células dendríticas e são essenciais para o desenvolvimento e a diferenciação de células T. Considerando que a inflamação imunomediada está envolvida na patogênese de doenças do miocárdio (por exemplo, insuficiência cardíaca e infarto agudo do miocárdio), as SOCS são essenciais na regulação de diversos processos nesse tecido. No coração as citocinas ativadoras das vias JAK-STAT têm papéis cardioprotetores por meio da inibição da apoptose, inibição do dano mitocondrial e estresse oxidativo, antiinflamação e angiogênese. Uma vez que SOCS3 é um potente inibidor das vias de sinalização JAK-STAT, estratégias para inibição de SOCS3 podem ser úteis para cardioproteção (YASUKAWA et al., 2012).

A proteína SOCS3 também parece influenciar o equilíbrio no processo de hipertrofia ventricular esquerda e consequentemente da insuficiência cardíaca. Sabe-se que a hipertrofia cardíaca patológica resulta de diversos estímulos, especialmente biomecânicos e neuro-humorais (GRADMAN; ALFAYOUMI, 2006). A hipertrofia é um mecanismo adaptativo do coração em resposta ao aumento da sua atividade ou de sobrecarga funcional. O resultado desse aumento de trabalho do coração traduz-se num aumento de massa cardíaca devido ao crescimento dos miócitos e/ou do estroma conjuntivo (MILL; VASSALLO, 2001). Esse processo assume importância em condições patológicas, pois diminui o desempenho cardíaco, contribui para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca e representa uma determinante independente da morbidade e mortalidade após infarto do miocárdio (GIBBONS et al., 2004; MATOS-SOUZA; FRANCHINI; NADRUZ-JUNIOR, 2008).

Foi demonstrado que a administração de citocinas, tais como G-CSF, EPO, IL-11 e LIF, pode prevenir o desenvolvimento da remodelação ventricular após infarto em animais (HARADA et al., 2005; HIRATA et al., 2006; MINATOGUCHI et al., 2004; OBANA et al., 2010; ZOU et al., 2003). Além disso, a família das citocinas IL-6, que inclui IL-6, CT-1 e LIF, é conhecida por mediar a hipertrofia cardíaca (KODAMA et al., 1997; PENNICA et al., 1995). Todas essas citocinas ativam a via JAK-STAT, que têm papel protetor no desenvolvimento do remodelamento ventricular esquerdo após infarto do miocárdio (BOLLI et al., 2003; YAMAUCHI-TAKIHARA, 2008).

A indução da via JAK-STAT e a deleção de SOCS3 em cardiomiócitos ativam as vias de sinalização cardioprotetoras, inibem a apoptose de cardiomiócitos e a fibrose cardíaca, aumentam a expressão de enzimas anti-oxidantes e previne o remodelamento ventricular após infarto (HIROTA et al., 1999; KUNISADA et al., 1998; OBA et al., 2012; SHENG et al., 1997). Dessa forma, a inibição de SOCS3 pode ser uma estratégia para aumentar o efeito cardioprotetor das citocinas ativadoras de JAK-STAT.

A doença de Chagas está diretamente associada ao comprometimento cardíaco. A cardiomiopatia chagásica é consequência de processo inflamatório intenso e multifocal no miocárdio e dano no endotélio vascular, que podem levar a arritmias, eventos tromboembólicos e insuficiência cardíaca (MORRIS et al., 1990; MARINETTO et al., 2007). Durante a fase crônica da doença há uma alta expressão de citocinas pró-inflamatórias e as condições fisiopatológicas cardíacas estão associadas com a ativação desses mediadores inflamatórios no coração.

Hovsepian e cols. (2013) observaram que a IL-6 produzida por cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* ativa STAT3 que, por sua vez, ativa SOCS3 envolvida na atenuação da sinalização pró-inflamatória. Corrêa-de-Santana e cols. (2006) demonstraram que a infecção de células AtT-20 por formas tripomastigotas do parasito resulta no aumento da fosforilação de STAT3, relacionada a um incremento na expressão de IL-6. Outrossim, experimentos com camundongos *knockout* para SOCS2 revelaram que essa proteína, capaz de regular a expressão de SOCS3, também é um potente regulador da resposta imune gerada pela infecção aguda de *T. cruzi* em um modelo animal (ESPER et al., 2012).

2.2.3 IL-28B

Na década de 50, Isaacs e Lindenmann em seus trabalhos com interferência viral, descobriram uma substância, liberada por células expostas a vírus que protegia essas células, e a qual eles denominaram interferon (IFN) (ISAACS; LINDENMANN, 1957 apud PESTKA et al., 2004, p. 936). O IFN foi a primeira citocina a ser identificada, purificada até à homogeneidade, clonada, completamente sequenciada, produzida na forma recombinante e usada terapêuticamente (BILLIAU, 2006).

Os IFNs são citocinas chaves para o estabelecimento da resposta antiviral. Três tipos distintos de IFNs são reconhecidos (tipos I, II, e III) com base nas suas características estruturais, uso do receptor e atividades biológicas (DONNELLY; KOTENKO, 2010). Embora todos os IFNs possam agir na proteção antiviral, seus papéis neste tipo de defesa podem variar. Esses mediadores são parte de uma grande família de citocinas chamada família-IFN-IL-10, que contém ainda as citocinas do tipo IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26), IFNs do tipo I (em seres humanos: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ and IFN- ω), IFN de tipo II (o IFN- γ) e IFNs do tipo III (os IFNs- λ) (GEORGE et al., 2012; WITTE et al., 2010).

Os IFNs e as citocinas relacionadas ao IL-10 são agrupados na mesma família porque todos agem através de receptores que compartilham certos motivos comuns nos seus domínios extracelulares (BAZAN, 1990; PESTKA et al., 2004). Estes receptores compreendem a família do receptor de citocinas de classe II (CRF2). Por esse motivo, os IFNs e as citocinas relacionadas com a IL-10 são por vezes referidos como citocinas “CRF2” (DONNELLY; KOTENKO, 2010).

Em 2003, três citocinas altamente relacionados foram descobertas independentemente, por dois grupos de pesquisa: IL-28A, IL-28B e IL-29 (KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003). Elas são também designadas como interferons (IFN)s- λ 2, λ 3 e λ 1, respectivamente, ou em conjunto, como IFNs tipo III. Esses mediadores demonstram características estruturais das citocinas relacionadas à IL-10, mas também induzem atividade antiviral em uma variedade de células-alvo, o que suporta a sua classificação funcional como um novo tipo de IFN (KOTENKO et al., 2004; SHEPPARD et al., 2003).

Os genes *IFN- λ* estão localizados em humanos juntos no cromossomo 19 (locus 19q13.13). Assim como os genes da família do IL-10, a região codificante do *IFN- λ* contem múltiplos éxons, sendo que o *IFN- λ 3*, ou *IL-28B*, contem 6 éxons (LI et al., 2008). Os genes que codificam as subunidades do receptor do IFN- λ , IFN- λ R1 (também conhecida como IL-28RA ou CRF2-12) e IL-10R2 estão localizadas em humanos no cromossomo 1 (locus 1p36.11) e no cromossomo 21 (locus 21q22.11), respectivamente (KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003).

As primeiras descrições de IL-28A, IL-28B e IL-29 demonstraram que o seu RNA mensageiro não é constitutivamente expresso, mas pode ser induzido em diferentes células hematopoiéticas e de origem não hematopoiética, característica que também é atribuída aos IFN do tipo I (KOTENKO et al., 2003; MALMGAARD et al., 2004; SHEPPARD et al., 2003). A expressão do IFN- λ foi detectada em baixos níveis em humanos no sangue, cérebro, pulmão, ovário, pâncreas, glândula pituitária, placenta, próstata e testículos (SHEPPARD et al., 2003).

Atualmente, os estudos sobre os polimorfismos do gene *IL-28B* estão associados principalmente com a resposta virológica em pacientes com hepatite C devido a habilidade dos interferons em induzir a atividade antiviral (DONNELLY et al., 2011). Cavalcante e cols. (2012) verificaram que os genótipos CC do rs12979860 e TT do rs8099917 tiveram papel protetor em pacientes portadores de hepatite C e estavam associados à resposta virológica sustentada nestes indivíduos. Sabe-se também que o alelo C e o genótipo CC do rs12979860 foram associados com a baixa carga viral em pacientes infectados com o vírus da hepatite B e com o dano hepático em pacientes com doença hepática gordurosa não-alcoólica (AL-QAHTANI et al., 2013; PETTA et al., 2012). Além disso, altos níveis séricos de IL-28B em indivíduos portadores do genótipo CC indicam que a presença do alelo C pode estar associada com a inibição da replicação viral em pacientes com hepatite B (AL-QAHTANI et al., 2013).

As proteínas IFN- λ exercem suas atividades através da ligação a um receptor complexo composto de única cadeia IFN- λ R1 (também conhecida como IL-28RA), e a cadeia IL-10R2, que também é parte de um complexo de receptores de IL-10, IL-22 e IL-26 (DONNELLY et al., 2004; KOTENKO et al., 2001). Por outro lado, todos os tipos de IFNs tipo I exercem suas atividades biológicas através de um complexo receptor composto pelas cadeias IFN- α R1 e IFN- α R2 e o IFN do tipo II (IFN- γ), por sua vez, usa as cadeias IFN- γ R1 e IFN- γ R2 para montar seu complexo receptor funcional. Embora os IFN- λ s não utilizem o complexo do receptor dos IFN tipo I para sinalização, a sinalização através dos complexos dos receptores dessas citocinas resulta na ativação da mesma cascata de transdução de sinal JAK-STAT (DONNELLY; KOTENKO, 2010).

O IFN- λ liga-se inicialmente à cadeia de IFN- λ R1 e o complexo formado provoca uma alteração conformacional que facilita o recrutamento da segunda cadeia do receptor, IL-10R2, para o complexo. Uma vez que o complexo está formado, as Janus tirosina cinases associadas ao receptor, Jak1 (Janus cinase 1) e Tyk2 (Tirosina cinase 2), medeiam a transfosforilação das cadeias do receptor, proporcionando locais de atração transitórios para as proteínas citosólicas STAT, incluindo STAT1 e STAT2. A sinalização através dos complexos de receptores do IFN do tipo I (IFN- α/β) ou do tipo III (IFN- λ) resulta na formação de um fator de transcrição, o fator gênico estimulado por IFN 3 (ISGF3). Este complexo é composto por três proteínas, STAT1, STAT2 e o fator regulatório de IFN-9 (IRF-9) (também conhecido como ISGF3g ou p48). Uma vez montado, o ISGF3 transloca para o núcleo onde se liga aos elementos de resposta estimulados por IFN nos promotores de vários ISGs (genes estimulados por IFN), estimulando a sua transcrição (Figura 3) (DONNELLY; DICKENSHEETS; O'BRIEN, 2011; LI et al., 2008).

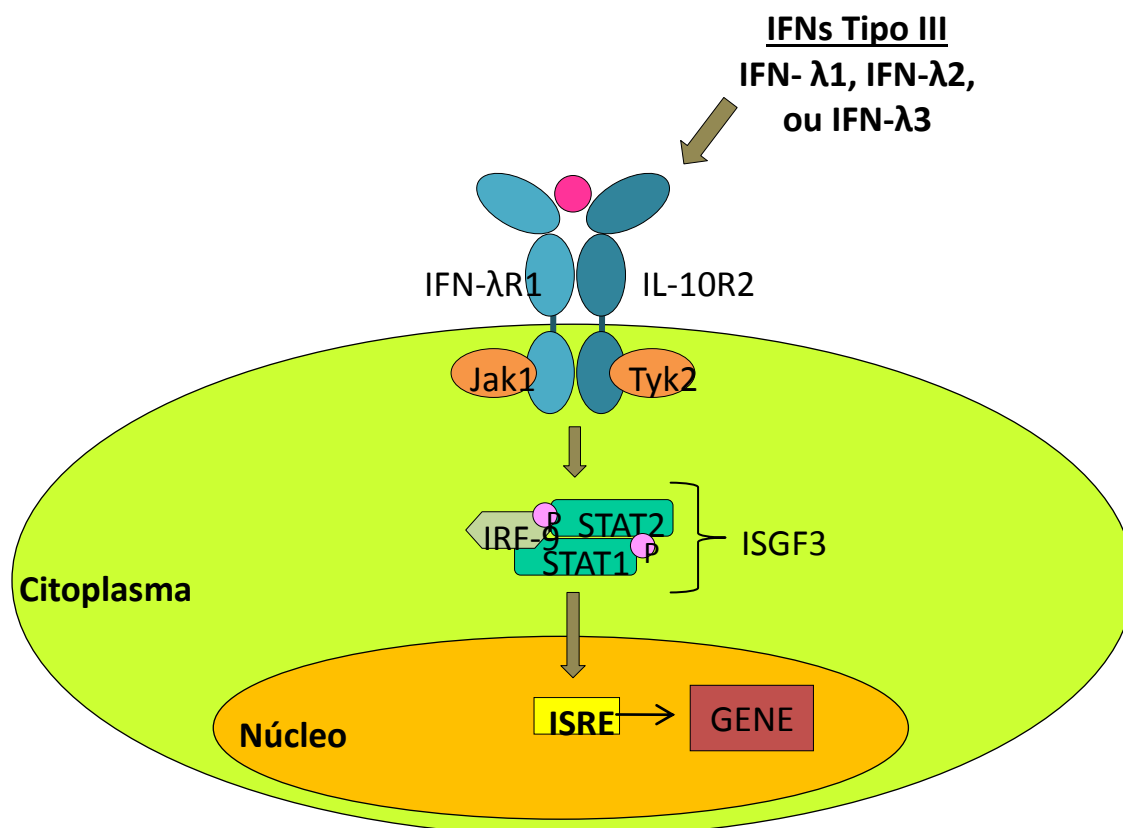


Figura 3. Ativação da via de sinalização JAK-STAT por IFN-λs. Ligação do IFN-λ ao complexo receptor (IFN-λR1 e IL-10R2) ativa a via de sinalização JAK-STAT e induz a transcrição de genes estimulados por IFN.

Adaptado de LOPUŠNÁ et al., 2013

Sabe-se que os IFN-λs podem afetar a expressão de diferentes citocinas que estão envolvidas no processo imunopatológico desencadeado pelo *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado. Citocinas são importantes na polarização da resposta imune e na manutenção e diferenciação de células. Na doença de Chagas, dados na literatura demonstram que citocinas inflamatórias são essenciais durante a fase aguda da infecção e são produzidas em níveis elevados na fase crônica da doença, possivelmente pela exposição crônica ao parasito (ABEL et al., 2001; FERREIRA et al., 2003; RIBEIRAO et al., 2000;). As citocinas anti-inflamatórias e reguladoras, por sua vez, agem na proteção do hospedeiro contra o dano tecidual provocado pelas reações inflamatórias.

Citocinas como IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-12, IL-6 e IL-18 estão envolvidas na polarização de resposta Th1 e agem na resistência ao parasito contra a infecção (ALIBERTI et al., 1996; BASSO, 2013; HUNTER et al., 1996; SILVA et al., 1992; SILVA et al., 1995). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 estão envolvidas nas respostas do tipo Th2, predominantes nas respostas anti-inflamatória e humoral do hospedeiro contra o parasito (MOSMANN; SAD, 1996; BASSO et al., 2013). Existem

também citocinas que estão envolvidas na regulação da resposta imune, a exemplo do IL-10 e TGF- β (LI et al., 2006; RONCAROLO et al., 2006).

Os dados sobre o potencial imunomodulador dos IFNs- λ sugerem que estas citocinas podem estar envolvidas nos mecanismos de defesa contra do *T. cruzi*. Essas moléculas, por induzir a polarização de células Th1, podem participar de processos inflamatórios desenvolvidos contra o parasito. Os efeitos do IFN- λ estão ainda relacionados com a expressão de moléculas SOCS que regulam a via de sinalização JAK-STAT, conforme descrito anteriormente. Esta, por sua vez, pode ser ativada por citocinas pró-inflamatórias altamente expressas na doença de Chagas, como IL-6.

Diante do exposto, pode-se perceber que o processo patológico desencadeado pelo *T. cruzi* pode ser afetado pela citocina *IL-28B*, influenciando o desenvolvimento das diferentes formas clínicas nos pacientes com doença de Chagas. Contudo, ainda há várias lacunas que dificultam o esclarecimento dos mecanismos imunológicos que resultam na cronificação da infecção e na piora do quadro clínico em pacientes portadores da doença de Chagas.

2.2.4 Claudina-1

Monocamadas de células epiteliais e endoteliais formam barreiras para separar os órgãos dos subcompartimentos funcionais. Esta compartimentalização e isolamento do ambiente externo são cruciais para o perfeito funcionamento dos organismos multicelulares. As células se mantêm unidas pelas junções intercelulares, que incluem estruturas como desmossomos, junções aderentes e junções ocludentes (*tight junctions*) (WEBER et al., 2008). Dessa forma, as células controlam as barreiras seletivas através da regulação do transporte de água, íons e proteínas através da monocamada, gerando assim a polaridade da estrutura e das funções celulares (FINDLEY; KOVAL, 2009; SCHNEEBERGER; LYNCH, 2004).

O movimento de íons e moléculas entre as células é conhecido como permeabilidade paracelular e é regulado pelos locais de contato célula-célula conhecidos como junções ocludentes, um complexo de proteínas periféricas e transmembranas ancoradas no citoesqueleto (FINDLEY; KOVAL, 2009; MENON-MIYAKE et al., 2005). As proteínas que compõe essas junções são as claudinas, ocludinas e outras proteínas associadas, tais como proteínas de *tight junctions* (Tjp1-3, também conhecida como ZO-1-3), receptor F11 (F11r, também conhecido como JAM-A ou JAM-1) e as

moléculas das junções adesivas 2 e 3 (Jam2 e Jam3, também conhecidas como JAMB e JAM-C) (STEED; BALDA; MATTER, 2010).

O principal papel das claudinas é a regulação da seletividade paracelular de íons pequenos. Essas proteínas foram inicialmente identificadas e caracterizadas pelos trabalhos do grupo do professor Shoichiro Tsukita, que demonstrou que fibroblastos, que normalmente não formam estas junções, quando transfectados com o cDNA da sequência das *tight junctions*, são capazes de expressá-las assim como fazem as células epiteliais (FURUSE et al., 1998a, FURUSE et al., 1998b).

Em mamíferos já foram encontrados 24 genes das proteínas claudinas. Os seres humanos e os chimpanzés têm 23 destes genes (falta o *CLDN-13*), enquanto que camundongos e ratos têm todos os 24. Os mecanismos exatos da evolução destes genes ainda são desconhecidos, embora alguns dados sugiram que essa família de genes evoluiu através de duplicações de genes no desenvolvimento dos cordados (KOLLMAR et al., 2001).

Apesar da estrutura das claudinas ainda não ter sido completamente elucidada, sabe-se que elas são formadas por duas alças extracelulares, uma intracelular e pelos domínios citosólicos N-terminal e C-terminal (WILL; FROMM; MÜLLER, 2008). O peso molecular varia de 20-25 kDa e há grande homologia entre as claudinas 1–10, 14, 15, 17 e 19. Portanto, associado a resultados funcionais, esse grupo de 14 proteínas é definido como claudina clássica, conforme definido pela árvore filogenética. Todas as outras claudinas são nomeadas claudinas não clássicas (KRAUSE et al., 2008).

O gene *CLDN-1* está localizado no cromossomo 3, locus 3q28-q29 e a proteína codificada é expressa principalmente em células da pele e do fígado. Experimentos com camundongos *knockout* para *CLDN-1* mostram a importância deste gene nas *tight junctions* da epiderme. Animais deficientes de *CLDN-1* morrem logo após o nascimento como consequência da desidratação pela perda de água transdérmica (FURUSE et al., 2002). Além disso, mutações no gene *CLDN-1* resultam em descamação progressiva da pele e obstrução das vias biliares, conhecido como colangite esclerosante neonatal com icterícia (HADJ-RABIA et al., 2004).

O *CLDN-1* está envolvido na infecção dos hepatócitos pelo vírus da Hepatite C (HCV). Já foi relatado que essas proteínas se localizam tanto nas *tight junctions* quanto nos espaços extrajuncionais dos hepatócitos, predominantemente no sítio apical (REYNOLDS et al., 2008; ZADORI et al., 2011). A expressão de *CLDN-1* também é diretamente afetada em processos neoplásicos. Esta expressão parece estar aumentada

durante tumorigenese de câncer de cólon, melanoma, carcinoma epidermóide oral e carcinoma hepatocelular (DHAWAN et al., 2005; LEOTLELA et al., 2007; REIS et al., 2008; YOON et al., 2010). Além disso, já foi demonstrado que a expressão dessa proteína está aumentada durante a metástase e que a inibição genética da sua expressão tem efeito direto na capacidade metastática de células tumorais (ESCUADERO-ESPARZA; JIANG; MARTIN, 2011; WEBER et al., 2008).

Em um estudo que avaliou a susceptibilidade para a infecção pelo vírus da hepatite C em indivíduos usuários de drogas injetáveis percebeu-se que os pacientes que permaneceram não infectados apresentavam frequentemente as variantes: alelo G para o rs9880018, alelo T para o rs9865082, alelo G para o rs10212165 e com menos frequência o alelo G para o rs9848283 (BEKKER et al., 2010). Em 2011, Benedetto e cols., por sua vez, observaram associação entre os SNPs do gene *CLDN-1* (rs17501010 e rs9290927) e a doença inflamatória dermatite atópica em duas populações norte americanas.

Atualmente não há trabalhos relacionando a expressão das proteínas claudinas e o processo imunopatológico desencadeado no hospedeiro portador da doença de Chagas. Contudo, sabendo que a polarização Th1/Th2 é importante no combate ao parasito, na sua permanência nos tecidos e posterior cronificação da doença de Chagas, as respostas imunes desencadeadas pelo *T. cruzi* podem modular a expressão de CLDN-1 em pacientes com doença de Chagas, alterando as junções ocludentes e o transporte paracelular (FLÓREZ; MARTÍN; GONZÁLEZ, 2011).

Fatores do hospedeiro e citocinas podem ter influência nas *tight junctions*, na expressão das claudinas e conseqüentemente no transporte de pequenos íons e moléculas entre as células (WALSH; HOPKINS; NUSRAT, 2000). Citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ e o TNF- α e anti-inflamatória como a IL-13 reduzem a expressão das claudinas e induzem aumento significativo na permeabilidade paracelular nas células epiteliais (AMASHEH et al., 2010; CHIBA et al., 2006; PRASAD et al., 2005; TEDELIND et al., 2003). Em contrapartida já foi documentado o aumento na expressão de CLDN-1 por IL-1 β e TNF- α em células de pacientes asmáticos e no câncer de mama e após estímulo com citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) em queratinócitos (BENEDETTO et al., 2011; FUGITA et al., 2011; LIU et al., 2012)

Em 2012, Bossche e cols., em um experimento com macrófagos estimulados por citocinas anti-inflamatórias do tipo Th2, também verificaram que a expressão de CLDN-1 é induzida por IL-4 e TGF- β em macrófagos murinos. Além disso, em

infecção experimental com *Trypanosoma congolense*, na qual a fase crônica é marcada pela presença de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e possivelmente TGF- β , percebeu-se forte indução da expressão de CLDN-1 em macrófagos esplênicos de camundongos cronicamente infectados, sugerindo que o *CLDN-1* pode ser um marcador gênico para macrófagos durante a fase crônica da Tripanossomíase Africana.

Ainda não está claro o mecanismo envolvido na regulação da expressão das proteínas claudinas por citocinas anti e pró-inflamatórias, nem há dados na literatura acerca do papel das proteínas das junções ocludentes na imunopatogênese da infecção chagásica. Neste contexto, o conhecimento da distribuição dos polimorfismos do gene *CLDN-1* pode auxiliar na compreensão destes processos e no estabelecimento de marcadores moleculares na doença.

2.2.5 CCL5

As quimiocinas são uma grande família de pequenas proteínas (cerca de 8-10 kDa) estruturalmente relacionadas que regulam o tráfico celular de vários tipos de leucócitos para áreas de lesão e desempenham papéis diferentes nos processos inflamatórios e homeostáticos (COLOBRAN et al., 2007; FLÓREZ; MARTÍN; GONZÁLEZ, 2012). As atividades biológicas das quimiocinas são mediadas pelas interações com os seus receptores de superfície celular que pertencem à superfamília dos receptores sete domínios transmembrana acoplados a proteínas G (CALZADA et al., 2001; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000)

Os vários membros da família de quimiocinas C-C demonstram um elevado grau de conservação da estrutura gênica e localização cromossômica (MILLER; KRANGEL, 1992; NELSON; PATTISON; KRENSKY, 1998). Os genes das quimiocinas C-C normalmente se encontram em um aglomerado de genes no cromossomo humano 17. O gene que codifica o CCL5 humano foi localizado no locus 17q11.2-q12 por hibridização *in situ* (DONLON et al., 1990). Assim como os genes das outras quimiocinas da família CC, o *CCL5* exibe uma localização de três exóons e dois íntrons (NELSON et al., 1993).

O estudo dos polimorfismos para o gene do *CCL5* em pacientes com anemia falciforme, doença de Chagas e infarto do miocárdio não demonstraram associações entre o desenvolvimento das doenças e as variações alélicas e/ou genotípicas dos SNPs

(FLÓREZ; MARTÍN; GONZÁLEZ 2012; KALAI et al., 2013; TERESHCHENKO et al., 2012).

O CCL5 é expresso por muitos tipos celulares em resposta a estímulos específicos. Von Luetichau e cols. (1996) demonstraram que tecidos normais apresentam poucas células expressando CCL5 e que essa expressão aumenta dramaticamente nos sítios inflamatórios. Dessa forma, a produção de CCL5, gerada predominantemente por células T CD8⁺, células epiteliais, fibroblastos e plaquetas, é uma característica particular da inflamação. O CCL5 atua como um potente quimioatratador para muitos outros tipos de células, tais como monócitos, células NK, células T de memória, eosinófilos e células dendríticas (DIEU et al., 1998; LOETSCHER et al., 1996; SCHALL et al., 1990; ROT et al., 1992).

O aumento da expressão de CCL5 tem sido associado com muitas patologias e distúrbios inflamatórios, incluindo rejeição do transplante alogênico, aterosclerose, artrite, dermatite atópica, distúrbios inflamatórios das vias respiratórias como asma, reações de hipersensibilidade do tipo tardio, glomerulonefrite, endometriose, alguns distúrbios neurológicos (tais como Doença de Alzheimer) e certos cânceres, como o câncer de mama (APPAY; ROWLAND-JONES, 2001; SORIA, BEN-BARUCH, 2008). O CCL5 também atua nas respostas imunes contra infecções virais, como contra o citomegalovírus humano (CMV) e o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Essa atribuição é particularmente importante, pois está envolvida no mecanismo de evasão de muitos vírus (APPAY; ROWLAND-JONES, 2001).

Além das quimiocinas, os receptores dessas proteínas também apresentam múltiplas funções. Dessa forma, eles não agem apenas na quimiotaxia, mas também medeiam a regulação de integrinas, a polimerização de actina, a degranulação e a proliferação celular. A maior parte dos efeitos biológicos das quimiocinas parece ser mediada principalmente através das interações com diferentes classes de receptores acoplados à proteína G (receptores serpentina) (MURPHY, 1994).

Até o momento um receptor específico para CCL5 não foi descrito. O CCR5, apesar de ser o principal receptor para CCL5, também pode se ligar ao MIP1a (CCL3) e MIP1b (CCL4) (CRAWFORD et al., 2011). O CCL5 também se liga a outros receptores, como CCR1, CCR3, receptor de quimiocinas Duffy e receptor de quimiocina US28 codificado pelo citomegalovírus humano (NELSON; PATTISON; KRENSKY, 1998). Além dos receptores específicos e de alta afinidade nos leucócitos e

eritrócitos, o CCL5 pode ainda interagir com proteoglicanos no endotélio que podem apresentar a quimiocina para os leucócitos circulantes (WITT; LANDER, 1994).

T. cruzi, o agente causador da doença de Chagas, é um parasito intracelular obrigatório de vários tipos celulares incluindo as células da linhagem monócito/macrófago. Moléculas inflamatórias desempenham um importante papel na infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que o controle da resposta contra o parasito depende da ativação de macrófagos mediada por citocinas. Estas, por sua vez, agem na imunopatogenese da doença de Chagas, recrutando células para os sítios inflamatórios e promovendo a resposta contra o parasito nas fases aguda e crônica da doença. Vários estudos indicam o papel fundamental de algumas citocinas (por exemplo, IFN- γ , TNF- α , e IL-12) na resistência ao *T. cruzi* (ALIBERTI et al., 1996; HUNTER et al., 1996; SILVA et al., 1992; SILVA et al., 1995).

Após replicação em tecidos do hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas e tripomastigotas começam a expressar moléculas que iniciam a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF- α por células da linhagem de macrófagos (CAMARGO et al., 1997). A IL-12, por sua vez, induz a síntese de IFN- γ por diferentes populações de células como células NK (do inglês, *natural killer*) e linfócitos. O IFN- γ combinado com o TNF- α produzem intermediários reativos de nitrogênio, como o óxido nítrico, que são tóxicos para o *T. cruzi* e agem no controle da sua replicação (HARDISON et al., 2006b; TALVANI et al., 2000). Outras citocinas (p. ex. IL-10, TGF- β , IL-4) auxiliam na regulação da resposta imune, prevenindo a ocorrência do processo inflamatório intenso e prejudicial ao organismo (SOARES; PONTES-DE-CARVALHO; RIBEIRO-DOS-SANTOS, 2001; SOUZA et al., 2014)

Acredita-se que as citocinas (ex.: IFN- γ , TNF- α , TGF- β e IL-10) modulam a expressão de quimiocinas que, por sua vez, levam à infiltração de células inflamatórias para os locais de lesão. Aliberti e cols. (2001) verificaram que IFN- γ e TNF- α aumentavam e TGF- β reduzia a expressão de CCL5 em macrófagos em modelo murino da doença de Chagas. Hardison e cols. (2006b) também observaram que a presença dos transcritos dessa quimiocina estava diretamente relacionada à expressão de IFN- γ e TNF- α , assim como a presença de células inflamatórias na fase aguda da doença e, apesar de haver declínio nos níveis das citocinas pró-inflamatórias na fase crônica, os níveis de CCL5 mantiveram-se elevados, sugerindo que essa quimiocina, associada a CXCL9 e CXCL10, pode ter papel na manutenção da inflamação crônica no coração.

Outros achados descrevem a presença de CCL5 no tecido cardíaco após infecção dos hospedeiros vertebrados com o parasito *T. cruzi*. Altos níveis de quimiocinas CC, especialmente CCL5 são detectados na miocardite crônica em modelo experimental da doença de Chagas (TALVANI et al., 2000). Nogueira e cols. (2012) demonstraram que células mononucleares expressando CCL5 podem ser encontradas no tecido miocárdico de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica e também já foi visto que formas tripomastigotas do *T. cruzi* induzem a expressão do RNA mensageiro dessa quimiocina em cardiomiócitos em modelo experimental da fase aguda da doença (MACHADO et al., 2000; MARINO et al., 2004).

Foi observado que além de macrófagos e do tecido cardíaco, outras células e tecidos apresentam aumento na expressão de CCL5 em modelo da doença de Chagas. Cutrullis e cols. (2009) perceberam aumento na expressão de CCL5 e do seu receptor, CCR5, no músculo estriado de animais infectados com *T. cruzi*. Essas moléculas, em associação com IFN- γ , TNF- α e TGF- β podem participar do recrutamento seletivo de linfócitos T CD8⁺ envolvidos na imunopatogênese da inflamação muscular observada na doença de Chagas aguda experimental (MAGALHÃES-SANTOS; ANDRADE, 2005). Nagajyothi e cols. (2008), por sua vez, documentaram aumento na expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, entre elas, CCL5, em adipócitos após infecção com *T. cruzi*. Também foi observado aumento de CCL5 no cerebelo de ratos infectados com o parasito quando comparados com os animais não infectados (RACHID et al., 2010).

Além disso, aumento na expressão de CCR5 foi detectado nos leucócitos de pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica e em camundongos infectados com *T. cruzi* decorrente dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o parasito (GOMES et al., 2005; SILVA et al., 2007; TALVANI et al., 2004). Animais deficientes de CCR5 apresentaram alta parasitemia, mortalidade e aumento no número de parasitos no músculo cardíaco quando comparados com camundongos normais. Ademais, foi visto inibição acentuada da migração de células T para o coração e maior susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* nestes animais (HARDISON et al., 2006a; MACHADO et al., 2005).

O nível de conhecimento obtido sobre os mecanismos envolvidos na infecção pelo *T. cruzi* e desenvolvimento das fases aguda e crônica ainda não é suficiente para compreender todas as formas da doença de Chagas, principalmente a cardiomiopatia chagásica crônica, a forma mais grave da doença. Os processos de persistência do *T.*

cruzi e a natureza das alterações imunológicas que permitem esta persistência são limitados devido ao nível de conhecimento atual sobre imunorregulação na infecção chagásica. O tratamento dos pacientes, principalmente na fase crônica, ainda é controverso e a identificação de biomarcadores pode ser útil no manejo clínico dos indivíduos infectados.

No presente trabalho foram estudados polimorfismos dos genes *LGALS3*, *SOCS3*, *IL-28B*, *CLDN-1* e *CCL5* com o intuito de conhecer as relações entre estes e as formas clínicas e o grau de fibrose em pacientes portadores da doença de Chagas na fase crônica. O estudo pode auxiliar no desenvolvimento de biomarcadores na doença e no esclarecimento dos mecanismos inerentes à infecção chagásica.

3 - OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a influência dos polimorfismos dos genes *CLDN-1*, *LGALS3*, *SOCS3*, *IL-28B*, *CCL5* na determinação das formas clínicas e graus de fibrose em pacientes portadores da doença de Chagas.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Comparar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos genéticos estudados entre os grupos de pacientes com relação às formas clínicas;
2. Comparar as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos genéticos estudados entre os grupos de pacientes com relação ao percentual do componente fibrótico no coração;
3. Correlacionar os polimorfismos genéticos, em pacientes portadores da doença de Chagas, com as formas clínicas e percentual do componente fibrótico no coração.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

As amostras utilizadas neste trabalho foram amostras de conveniência, não probabilísticas, obtidas a partir de outro estudo clínico desenvolvido no Hospital São Rafael para avaliar o syndecan-4 como biomarcador para a determinação prognóstica de portadores de doença de Chagas. Dentre os 55 pacientes selecionados para o estudo clínico, 17 eram portadores da doença de Chagas na forma indeterminada e 38 portadores da cardiomiopatia chagásica (15 com forma cardíaca sem disfunção ventricular e 23 com forma cardíaca com disfunção ventricular) que foram acompanhados regularmente no ambulatório de insuficiência cardíaca do Hospital São Rafael.

Todos os pacientes consentiram com a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme a resolução n.º. 466/12 do CNS – Conselho Nacional de Saúde. O protocolo foi realizado conforme aspectos éticos de acordo com as normas vigentes, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Rafael e o parecer de aprovação está disponível na Plataforma Brasil (número 397.457).

4.1.1 Desenho do estudo

Estudo de corte transversal

4.1.2 Critérios de inclusão

- Doença de Chagas confirmada por duas sorologias diferentes;
- Em uso de terapia farmacológica
- Classe funcional II-III-IV da New York Heart Association (pacientes com insuficiência cardíaca variando de sintomas leves e limitações em atividades rotineiras à limitações severas e presença dos sintomas mesmo em repouso) e portadores da forma indeterminada.

4.1.3 Critérios de exclusão

- Doença valvar significativa definida como estenose aórtica com gradiente VE/Ao > 50 mmHg, estenose mitral com área valvar inferior a 1,5 cm² ou regurgitações aórtica e/ou mitral superiores a moderadas;
- Uso crônico de agentes imunossupressores;
- Portador de insuficiência renal terminal em tratamento dialítico;
- Febre nas últimas 48 horas ou evidência de infecção sistêmica em atividade de acordo com a definição de sepse do ACCP/SCCM (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine);
- Uso abusivo de álcool ou drogas ilícitas em curso;
- Qualquer co-morbidade com impacto na sobrevida nos próximos dois anos;
- Doença hepática em atividade;
- Doença pulmonar obstrutiva crônica em uso contínuo de esteroides;
- Doenças hematológicas, neoplásicas, ósseas ou distúrbios da hemostasia;
- Doenças inflamatórias ou infecciosas crônicas.

4.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

4.2.1 Extração do ácido desoxirribonucléico (DNA)

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de células mononucleares do sangue periférico, separadas após a coleta de 5 mL de sangue com tubo vacutainer (Becton Dickinson, Califórnia, USA).

A extração do DNA foi realizada com a utilização do kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram conservadas em freezer a -20°C.

4.2.2 Genotipagem dos polimorfismos

A metodologia empregada para genotipagem dos polimorfismos foi o PCR em tempo real. O sistema utilizado para realização dessa reação foi o TaqMan (Life Technologies, Carlsbad, USA). Estes SNPs foram amplificados usando o protocolo TaqMan Universal PCR (Life Technologies). Os genótipos foram determinados usando

o software Sequence Detection Systems versão 1.3.1 (Life Technologies). As probes e os primers selecionados para os SNPs foram desenhados pela mesma empresa.

O PCR em tempo real é baseado no uso de uma sonda fluorescente, com sequências específicas para cada alelo; cada sonda foi marcada com um fluoróforo diferente e hibridiza com a sequência alvo gerando sinal fluorescente proporcional à concentração dos produtos amplificados. Assim, é possível correlacionar à intensidade de sinal coletada com a quantidade de produto amplificado.

Nesse sistema, a sonda hibridiza na região complementar do DNA alvo que está localizada entre os sítios de ligação dos primers. Após a amplificação é feita a discriminação alélica, onde a intensidade de cada fluoróforo, associado a um determinado alelo, é quantificada. Os diferentes genótipos emitem fluorescência correspondente a cada alelo marcado, alelo 1 com o fluoróforo VIC e o alelo 2 com o fluoróforo FAM. Se ambos os alelos apresentarem fluorescência teremos um genótipo heterozigoto.

Foram analisados onze SNPs localizados em cinco diferentes genes (*LGALS3*, *SOCS3*, *IL-28B*, *CLDN-1*, *CCL5*). Os polimorfismos dos genes *CLDN-1*, *IL-28B* e *SOCS3* estavam localizados na região promotora do gene, o polimorfismo do gene *CCL5* na região intrônica e os do gene *LGALS3* na região exônica envolvendo, estes últimos, alteração dos aminoácidos (Tabela 1).

Os polimorfismos estudados do gene *LGALS3*, localizado no cromossomo 14, foram rs4644 e rs4652. O rs4644 envolve a substituição de uma adenina por uma citosina, resultando na troca do aminoácido prolina por histidina na proteína. O rs4652 substitui adenina por uma citosina, ocorrendo a troca de uma treonina por uma prolina.

O polimorfismo do gene *SOCS3* encontra-se no cromossomo 17 substituindo o alelo A pelo alelo G.

Foram analisados dois SNPs para o gene *IL-28B*, o rs12979860 e o rs8099917, envolvendo a substituição de citosina por timina e guanina por timina, respectivamente.

Os polimorfismos analisados do gene *CLDN-1* foram os rs10212165, substituindo o alelo A pelo alelo G; rs3909582 alelo A pelo G; rs9865082, alelo C pelo alelo T; rs9848283, alelo A pelo G; e rs9880018 alelo A pelo G.

Por fim, foi avaliado um SNP no gene *CCL5* no rs2280789, envolvendo a troca de uma adenina por uma guanina.

Tabela 1. Polimorfismos dos genes estudados (*LGALS3*, *SOCS3*, *IL-28B*, *CLDN-1* e *CCL5*)

<i>Locus</i>	rs	Polimorfismo Alelo 1>Alelo 2	Localização	Região	Tipo de Mutação
<i>LGALS3</i>	4652	A>C	+292 (14q21-q22)	Exón	Não- sinônima
	4644	C>A	+191 (14q21-q22)	Exón	
<i>SOCS3</i>	4969170	A>G	-4874 (17q25)	Promotor	-
<i>IL-28B</i>	12979860	C>T	-3176 (19q13.13)	Promotor	-
	8099917	G>T	-3619 (19q13.13)	Promotor	
<i>CLDN-1</i>	10212165	A>G	-5414 (3q28-q29)	Promotor	-
	3909582	A>G	-24218 (3q28-q29)	Promotor	
	9865082	C>T	-7153 (3q28-q29)	Promotor	
	9848283	A>G	-2983 (3q28-q29)	Promotor	
	9880018	A>G	-15312 (3q28-q29)	Promotor	
<i>CCL5</i>	2280789	C>T	+1 (17q11.2-q12)	Íntron	-

Fonte: ANGELO et al., 2013; BEKKER et al., 2010; JARVIS et al., 2012; KALAI et al., 2013; SUGIYAMA et al., 2011; TROMPET et al., 2012.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância das eventuais diferenças entre proporções foi calculada pelo teste do Chi-Quadrado e teste exato de Wilcoxon. Variáveis contínuas foram comparadas utilizando o teste T de Student para variáveis paramétricas e o teste de Mann-Whitney quando as distribuições foram não paramétricas.

Foi considerado um erro alfa de 5% e intervalo de confiança de 95%.

A análise das frequências alélicas entre os grupos foram realizadas pelo programa GENEPOP (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

Os pacientes foram divididos em dois grupos com relação ao grau de fibrose (menor ou maior do que 15% de fibrose cardíaca) baseado no trabalho de Uellendahl, 2007, segundo o qual a quantidade de fibrose miocárdica em pacientes com doença de Chagas é, em média, de 18%.

5 - RESULTADOS

O estudo incluiu 55 pacientes portadores da doença de Chagas na fase crônica. Dezesete eram portadores da doença de Chagas na forma indeterminada e 38 portadores da cardiomiopatia chagásica (15 com forma cardíaca sem disfunção ventricular e 23 com forma cardíaca com disfunção ventricular).

Trinta e sete indivíduos residiam em Salvador, nove em Lauro de Freitas e os demais em outras cidades do estado da Bahia (Acajutiba, Chorrochó, Dom Avelar, Esplanada, Feira de Santana, Morro do Chapéu, Simões Filho e Várzea Nova).

Entre os pacientes do estudo, 23 (41,82%) eram indivíduos do gênero masculino e 32 (58,18%) do feminino. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos gêneros masculino e feminino entre os pacientes com as formas indeterminada, cardíaca sem disfunção ventricular e cardíaca com disfunção ventricular (Tabela 2).

Tabela 2. Dados demográficos

Características	Forma			p-val*
	IND n=17	CSDV n=15	CCDV n=23	
Gênero				
Masculino	6 (27,3%)	5 (22,7%)	11 (50,0%)	0,402
Feminino	11 (33,3%)	10 (30,3%)	12 (36,4%)	
Idade**	56,23 ± 9,10	55,53 ± 8,27	56,67 ± 9,73	

IND – Forma indeterminada

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

**Idade em anos expressa em média ± desvio padrão

A idade dos pacientes variou de 35 a 75 anos, com média de 56,23 ± 8,93 anos (± desvio padrão) (Tabela 2). Quando divididos em grupos, a idade foi semelhante em ambos os grupos (p=0,15) sendo a média de 56,23 ± 9,10 anos (± desvio padrão) entre os pacientes do grupo com a forma indeterminada da doença e 56,23 anos ± 9,10 (± desvio padrão) entre os pacientes com a forma cardíaca (55,53 ± 8,27 anos entre os pacientes com a forma cardíaca sem disfunção ventricular e 56,67 ± 9,73 anos naqueles com a forma cardíaca com disfunção ventricular).

Na amostra estudada, até o momento, 49 pacientes tinham sido submetidos à ressonância magnética para estadiamento do grau de fibrose cardíaca, conforme Azevedo Filho e cols. (2009). Trinta e nove pacientes (79,59%) apresentaram percentual de fibrose menor do que 15%, enquanto 10 (20,41%) apresentaram percentual de fibrose maior do que 15%.

Comparando os dados de percentual de fibrose obtidos com a forma clínica da doença, pode-se observar que 30,91% (n=17) dos pacientes apresentaram a forma indeterminada da doença, enquanto 69,09% (n=38) eram portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, sendo que 27,27% (n=15) destes apresentavam a forma cardíaca sem disfunção e 41,81% (n=23) a forma cardíaca com disfunção ventricular.

5.1 SNPs DO GENE *LGALS3*

Os polimorfismos do gene *LGALS3* (rs4644 e rs4652), mostraram associação estatisticamente significativa com a forma clínica da doença. O genótipo heterozigoto CA foi significativamente mais prevalente nos grupos com forma cardíaca quando comparados aos grupos com a forma indeterminada para ambos os SNPs (82,4% vs. 17,6%, p=0,008 e 78,3% vs. 21,7%, p=0,007) (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *LGALS3* e forma clínica em pacientes com doença de Chagas.

Genótipo	IND n=17	CD n=38	p-val*
rs4644			
Homozigoto CC	11 (37,9%)	18 (62,1%)	0,194
Heterozigoto CA	3 (17,6%)	14 (82,4%)	0,008
Homozigoto AA	3 (33,3%)	6 (66,7%)	0,317
rs4652			
Homozigoto AA	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,480
Heterozigoto AC	5 (21,7%)	18 (78,3%)	0,007
Homozigoto CC	9 (37,5%)	15 (62,5%)	0,221

IND – Forma indeterminada

CD – Forma cardíaca

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas dos polimorfismos rs4644 e rs4652 do gene *LGALS3* e as formas clínicas da doença de Chagas (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene *LGALS3* e forma clínica em pacientes com doença de Chagas

Alelos	IND n=17	CD n=38	p-val*	OR**	IC95%***
rs4644					
C	0,679	0,632	0,551	1,248	0,70-2,24
A	0,321	0,368			
rs4652					
A	0,324	0,368	0,551	1,248	0,70-2,24
C	0,676	0,632			

IND – Forma indeterminada

CD – Forma cardíaca

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “*Odds Ratio*”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

Analisando os pacientes com relação à presença ou ausência de disfunção cardíaca, não houve associação estatisticamente significativa entre os genótipos dos SNPs do gene *LGALS3* e as formas cardíacas nos grupos de pacientes com as formas cardíaca sem disfunção ventricular e cardíaca com disfunção ventricular (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *LGALS3* e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	CSDV n=15	CCDV n=23	p-val*
rs4644			
Homozigoto CC	6 (33,3%)	12 (66,7%)	0,157
Heterozigoto CA	6 (42,0%)	8 (57,1%)	0,593
Homozigoto AA	3 (50,0%)	3 (50,0%)	1,000
rs4652			
Homozigoto AA	3 (60,0%)	2 (40,0%)	0,665
Heterozigoto AC	7 (38,9%)	11 (61,1%)	0,346
Homozigoto CC	5 (33,3%)	10 (66,7%)	0,197

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

A análise da frequência alélica para os SNPs rs4644 e rs4652 não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de pacientes com as formas cardíaca sem disfunção ventricular e cardíaca com disfunção ventricular (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene *LGALS3* e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas.

Alelos	CSDV n=15	CCDV n=23	p-val*	OR**	IC95%***
rs4644					
C	0,571	0,675	0,144	0,623	0,35-1,11
A	0,429	0,325			
rs4652					
A	0,433	0,326	0,190	0,629	0,37-1,12
C	0,567	0,674			

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

Analisando os pacientes com relação ao grau de fibrose, a distribuição dos genótipos do gene *LGALS3* mostrou dados estatisticamente significantes. O genótipo homocigoto CC foi significativamente mais prevalente no grupo com fibrose <15% quando comparado ao grupo com fibrose ≥15% para ambos os polimorfismos (88,0% vs. 12,0%, p<0,001 e 85,0% vs. 15,0%, p=0,002, respectivamente) (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *LGALS3* e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas.

Genótipo	Fibrose <15% n=39	Fibrose ≥15% n=10	p-val*
rs4644			
Homozigoto CC	22 (88,0%)	3 (12,0%)	<0,001
Heterozigoto CA	9 (56,3%)	7 (43,8%)	0,617
Homozigoto AA	8 (100,0%)	0 (0,0%)	-
rs4652			
Homozigoto AA	8 (100,0%)	0 (0,0%)	-
Heterozigoto CA	14 (66,7%)	7 (33,3%)	0,127
Homozigoto CC	17 (85,0%)	3 (15,0%)	0,002

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

A análise da frequência alélica para os SNPs rs4644 e rs4652 não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com maior ou menor percentual de fibrose cardíaca (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene *LGALS3* e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas

Alelos	Fibrose <15% n=39	Fibrose ≥15% n=10	p-val*	OR**	IC95%***
rs4644					
C	0,625	0,650	0,769	0,878	0,49-1,56
A	0,375	0,350			
rs4652					
A	0,385	0,350	0,769	0,878	0,49-1,56
C	0,615	0,650			

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

5.2 SNPs DO GENE *SOCS3*

Para o gene *SOCS3*, houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas. O grupo de pacientes com a forma cardíaca mostrou maior prevalência dos genótipos AG e GG quando comparado com o grupo com a forma indeterminada da doença de Chagas (80,0% vs. 19,2%, p=0,002 e 87,5% vs. 12,5%, p=0,034, respectivamente) (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene *SOCS3* e forma clínica em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	IND n=17	CD n=38	p-val*
rs4969170			
Homozigoto AA	11 (52,4%)	10 (47,6%)	0,827
Heterozigoto AG	5 (19,2%)	21 (80,8%)	0,002
Homozigoto GG	1 (12,5%)	7 (87,5%)	0,034

IND – Forma indeterminada

CD – Forma cardíaca

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Para o polimorfismo do *SOCS3*, a frequência do alelo A foi maior no grupo com a forma indeterminada do que no grupo com a forma cardíaca ($p < 0,0001$), demonstrando associação protetora em relação a doença de Chagas (Tabela 10).

Tabela 10. Frequência dos alelos do polimorfismo do gene *SOCS3* e forma clínica em pacientes com doença de Chagas

Alelos	IND n=17	CD n=38	p-val*	OR**	IC95%***
rs4969170					
A	0,812	0,539	<0,001	0,275	0,15-0,52
G	0,188	0,461			

IND – Forma indeterminada

CD – Forma cardíaca

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “*Odds Ratio*”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos e das frequências alélicas para o polimorfismo do *SOCS3* entre os pacientes dos grupos com as formas cardíacas com e sem disfunção ventricular da doença de Chagas (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11. Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene *SOCS3* e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	CSDV n=15	CCDV n=23	p-val*
rs4969170			
Homozigoto AA	4 (40,0%)	6 (60,0%)	0,527
Heterozigoto AG	7 (33,3%)	14 (66,7%)	0,127
Homozigoto GG	4 (57,1%)	3 (42,9%)	0,705

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Tabela 12. Frequência dos alelos do polimorfismo do gene *SOCS3* e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas

Alelos	CSDV n=15	CCDV n=23	p-val*	OR**	IC95%***
rs4969170					
A	0,500	0,565	0,395	0,754	0,43-1,32
G	0,500	0,435			

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

Foi observada associação entre o genótipo AA do gene *SOCS3* e grau de fibrose. O genótipo AA foi significativamente mais prevalente no grupo com fibrose <15% quando comparado ao grupo com fibrose cardíaca ≥15% (85,7% vs. 14,3%, p=0,001) (Tabela 13).

Tabela 13. Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene *SOCS3* e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	Fibrose <15% n=39	Fibrose ≥15% n=10	p-val*
rs4969170			
Homozigoto AA	18 (85,7%)	3 (14,3%)	0,001
Heterozigoto AG	15 (71,4%)	6 (28,6%)	0,050
Homozigoto GG	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0,059

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos alelos do gene *SOCS3* em relação ao grau de fibrose cardíaca (Tabela 14).

Tabela 14. Frequência dos alelos do polimorfismo do gene *SOCS3* e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas

Alelos	Fibrose <15% n=39	Fibrose ≥15% n=10	p-val*	OR**	IC95%***
rs4969170					
A	0,658	0,600	0,464	1,294	0,75-2,30
G	0,342	0,400			

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

5.3 SNPs DO GENE *IL-28B*

O polimorfismo do gene *IL-28B* para o rs12979860 mostrou diferença estatisticamente significativa apenas para o genótipo heterozigoto CT quando comparados os grupos de pacientes com a forma indeterminada e a forma cardíaca da doença de Chagas (22,7% vs. 77,3%, $p=0,011$) (Tabela 15). Em relação ao segundo polimorfismo na região promotora do gene *IL-28B*, rs8099917, apenas o genótipo homozigoto TT foi significativamente mais frequente nos pacientes com a forma cardíaca do que nos pacientes com a forma indeterminada da doença (74,4% vs. 25,6%, $p=0,002$) (Tabela 15).

Tabela 15. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *IL-28B* e forma clínica em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	IND n=17	CD n=38	p-val*
rs12979860			
Homozigoto CC	5 (27,8%)	13 (72,2%)	0,059
Heterozigoto CT	5 (22,7%)	17 (77,3%)	0,011
Homozigoto TT	7 (41,2%)	8 (53,3%)	0,796
rs8099917			
Homozigoto GG	1 (50%)	1 (50%)	1,000
Heterozigoto GT	6 (42,9%)	8 (57,1%)	0,286
Homozigoto TT	10 (25,6%)	29 (74,4%)	0,002

IND – Forma indeterminada

CD – Forma cardíaca

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas para ambos os SNPs do gene *IL-28B* em relação à forma clínica da doença de Chagas (Tabela 16).

Tabela 16. Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene *IL-28B* e forma clínica em pacientes com doença de Chagas

Alelos	IND n=17	CD n=38	p-val*	OR**	IC95%***
rs12979860					
C	0,441	0,566	0,089	0,593	0,34-1,04
T	0,559	0,434			
rs8099917					
G	0,219	0,132	0,197	1,733	0,83-3,62
T	0,781	0,868			

IND – Forma indeterminada

CD – Forma cardíaca

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição genotípica dos polimorfismos do *IL-28B* entre os grupos de pacientes com as formas cardíacas com e sem disfunção ventricular (Tabelas 17).

Tabela 17. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *IL-28B* e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	CSDV n=15	CCDV n=23	p-val*
rs12979860			
Homozigoto CC	7 (53,8%)	6 (46,2%)	0,782
Heterozigoto CT	6 (35,3%)	11 (64,7%)	0,225
Homozigoto TT	2 (25,0%)	6 (75,0%)	0,157
rs8099917			
Homozigoto GG	0 (0,0%)	1 (100,0%)	-
Heterozigoto GT	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,480
Homozigoto TT	12 (41,4%)	17 (58,5%)	0,353

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Para o rs12979860, o alelo C foi associado com proteção, sendo mais frequente no grupo de indivíduos com a forma cardíaca sem disfunção ventricular (p=0,021) (Tabela 18).

Tabela 18. Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene *IL-28B* e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas

Alelos	CSDV n=15	CCDV n=23	p-val*	OR**	IC95%***
rs12979860					
C	0,667	0,500	0,021	0,492	0,28-0,87
T	0,333	0,500			
rs8099917					
G	0,100	0,152	0,393	0,629	0,26-1,48
T	0,900	0,848			

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

Houve associação entre os polimorfismos do gene *IL-28B* e grau de fibrose. No rs12979860, somente foi observada uma diferença estatisticamente significativa em relação à fibrose para o genótipo CC, sendo que 94,1% dos pacientes apresentaram fibrose cardíaca <15% enquanto 5,9% dos pacientes apresentaram fibrose ≥15% (p<0,001) (Tabela 19). Em relação ao rs8099917, o genótipo homozigoto TT foi mais frequente entre os pacientes com grau de fibrose <15% (80,0% vs. 20,0%, p<0,001) (Tabela 19).

Tabela 19. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *IL-28B* e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas.

Genótipo	Fibrose <15% n=39	Fibrose ≥15% n=10	p-val*
rs12979860			
Homozigoto CC	16 (94,1%)	1 (5,9%)	<0,001
Heterozigoto CT	14 (70,0%)	6 (30,0%)	0,074
Homozigoto TT	9 (75,0%)	3 (25,0%)	0,083
rs8099917			
Homozigoto GG	1 (100,0%)	0 (0,0%)	-
Heterozigoto GT	10 (76,9%)	3 (23,1%)	0,052
Homozigoto TT	28 (80,0%)	7 (20,0%)	<0,001

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas apenas para o SNP rs12979860 do gene *IL-28B* entre os grupos de pacientes

com relação ao grau de fibrose (Tabela 20). O alelo T esteve associado com maior grau de fibrose ($p=0,011$).

Tabela 20. Frequência dos alelos do polimorfismo do gene *IL-28B* e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas

Alelos	Fibrose <15% n=39	Fibrose ≥15% n=10	p-val*	OR**	IC95%***
rs12979860					
C	0,590	0,400	0,011	2,159	1,23-3,80
T	0,410	0,600			
rs8099917					
G	0,145	0,150	1,156	1,000	0,46-2,17
T	0,855	0,850			

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

5.4 SNPs DO GENE *CLDN-1*

Foram analisados cinco polimorfismos do gene *CLDN-1* (rs10212165, rs3909582, rs9865082, rs9880018, rs9848228). As análises dos polimorfismos do gene *CLDN-1* revelam que para os rs10212165, rs3909582, rs9880018 e rs9848283 houve diferença estatisticamente significativa com relação às formas clínicas e aos graus de fibrose. Para os quatro polimorfismos mencionados, o genótipo AG foi mais frequente na forma cardíaca do que na forma indeterminada (72,0% vs. 28,0%, $p=0,028$; 73,7% vs. 26,3%, $p=0,039$; 70,8% vs. 29,2%, $p=0,041$; e 85,7% vs. 14,3%, $p=0,001$, respectivamente). Por outro lado, o polimorfismo rs9865082 mostrou diferença estatisticamente significativa apenas para o genótipo homozigoto CC quando comparados os grupos com as formas chagásicas crônicas indeterminada e cardíaca (27,3% vs. 72,7%, $p=0,009$) (Tabela 21).

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas para o rs10212165 e as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas ($p=0,007$) (Tabela 22).

Tabela 21. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *CLDN-1* e forma clínica em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	IND n=17	CD n=38	p-val*
rs10212165			
Homozigoto AA	10 (40,0%)	15 (60,0%)	0,317
Heterozigoto AG	7 (28,0%)	18 (72,0%)	0,028
Homozigoto GG	0 (0,0%)	5 (100,0%)	-
rs3909582			
Homozigoto AA	7 (33,3%)	14 (66,7%)	0,127
Heterozigoto AG	5 (26,3%)	14 (73,7%)	0,039
Homozigoto GG	5 (33,3%)	10 (66,7%)	0,197
rs9865082			
Homozigoto CC	9 (27,3%)	24 (72,7%)	0,009
Heterozigoto CT	7 (36,8%)	12 (63,2%)	0,251
Homozigoto TT	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,564
rs9880018			
Homozigoto AA	0 (0,0%)	1 (100%)	-
Heterozigoto AG	7 (29,2%)	17 (70,8%)	0,041
Homozigoto GG	10 (33,3%)	20 (66,7%)	0,068
rs9848283			
Homozigoto AA	12 (41,4%)	17 (58,6%)	0,353
Heterozigoto AG	3 (14,3%)	18 (85,7%)	0,001
Homozigoto GG	2 (40,0%)	3 (60,0%)	0,655

IND – Forma indeterminada

CD – Forma cardíaca

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Tabela 22. Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene *CLDN-1* e forma clínica em pacientes com doença de Chagas

Alelos	IND n=17	CD n=38	p-val*	OR**	IC95%***
rs10212165					
A	0,812	0,632	0,007	0,399	0,21-0,76
G	0,188	0,368			
rs3909582					
A	0,559	0,541	0,887	1,084	0,62-1,89
G	0,441	0,459			
rs9865082					
C	0,767	0,800	0,601	0,826	0,42-1,62
T	0,233	0,200			
rs9880018					
A	0,188	0,250	0,393	0,704	0,36-1,38
G	0,812	0,750			
rs9848283					
A	0,794	0,684	0,075	0,531	0,28-1,01
G	0,206	0,316			

IND – Forma indeterminada

CD – Forma cardíaca

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

Não foi observada uma diferença estatisticamente significativa em nenhum dos polimorfismos analisados do gene *CLDN-1* em relação as formas cardíacas sem disfunção ventricular e com disfunção ventricular (Tabelas 23 e 24).

Tabela 23. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *CLDN-1* e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	CSDV n=15	CCDV n=23	p-val*
rs10212165			
Homozigoto AA	7 (46,7%)	8 (53,3%)	0,796
Heterozigoto AG	7 (38,9%)	11 (61,1%)	0,346
Homozigoto GG	1 (20,0%)	4 (80,0%)	0,180
rs3909582			
Homozigoto AA	5 (35,7%)	9 (64,3%)	0,285
Heterozigoto AG	6 (42,9%)	8 (57,1%)	0,593
Homozigoto GG	4 (40,0%)	6 (60,0%)	0,527
rs9865082			
Homozigoto CC	11 (45,8%)	13 (54,2%)	0,683
Heterozigoto CT	4 (33,3%)	8 (66,7%)	0,248
Homozigoto TT	0 (0,0%)	2 (100,0%)	-
rs9880018			
Homozigoto AA	1 (100,0%)	0 (0,0%)	-
Heterozigoto AG	5 (29,4%)	12 (70,6%)	0,090
Homozigoto GG	9 (45,0%)	11 (55,0%)	0,655
rs9848283			
Homozigoto AA	5 (29,4%)	12 (70,6%)	0,090
Heterozigoto AG	8 (44,4%)	10 (55,6%)	0,637
Homozigoto GG	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,564

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Tabela 24. Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene *CLDN-1* e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas

Alelos	CSDV n=15	CCDV n=23	p-val*	OR**	IC95%***
rs10212165					
A	0,700	0,587	0,139	1,621	0,91-2,91
G	0,300	0,413			
rs3909582					
A	0,500	0,565	0,479	0,785	0,45-1,37
G	0,500	0,435			
rs9865082					
C	0,846	0,765	0,153	1,789	0,87-3,66
T	0,154	0,235			
rs9880018					
A	0,233	0,261	0,742	0,850	0,45-1,62
G	0,767	0,739			
rs9848283					
A	0,600	0,739	0,050	0,527	0,29-0,96
G	0,400	0,261			

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

Houve associação entre os polimorfismos do gene *CLDN-1* e grau de fibrose. Para o rs10212165 os genótipos AA e AG foram significativamente mais prevalentes no grupo com menor percentual de fibrose cardíaca quando comparado com o grupo com maior grau de fibrose (85,7% vs. 14,3%, p=0,001 e 70,8% vs. 29,2%, p=0,041, respectivamente). A análise do rs3909582 revelou que todos os genótipos eram mais prevalentes no grupo com fibrose <15% em relação ao grupo com fibrose ≥15% (76,5% vs. 23,5%, p=0,029 para AA e AG; 86,7% vs. 13,3%, p=0,005 para GG). Em relação ao rs9865082, os genótipos CC e CT estiveram estatisticamente mais presentes no grupo de pacientes com fibrose <15% em relação ao grupo com maior percentual de fibrose cardíaca (78,6% vs. 21,4%, p=0,002 e 83,3% vs. 16,7%, p=0,005, respectivamente). Para o rs9880018 prevaleceram os genótipos AG e GG no grupo com fibrose <15% quando comparado com o outro grupo (77,3% vs. 22,7%, p=0,011; 80,8% vs. 19,2%, p=0,002, respectivamente). O rs9848283 apresentou diferença estatisticamente

significante apenas para o genótipo homozigoto AA entre os pacientes com fibrose <15% (84,6% vs. 15,4%, $p < 0,001$) (Tabela 25).

Tabela 25. Distribuição dos genótipos dos polimorfismos do gene *CLDN-1* e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	Fibrose <15% n=39	Fibrose ≥15% n=10	p-val*
rs10212165			
Homozigoto AA	18 (85,7%)	3 (14,3%)	0,001
Heterozigoto AG	17 (70,8%)	7 (29,2%)	0,041
Homozigoto GG	4 (100,0%)	0 (0,0%)	-
rs3909582			
Homozigoto AA	13 (76,5%)	4 (23,5%)	0,029
Heterozigoto AG	13 (76,5%)	4 (23,5%)	0,029
Homozigoto GG	13 (86,7%)	2 (13,3%)	0,005
rs9865082			
Homozigoto CC	22 (78,6%)	6 (21,4%)	0,002
Heterozigoto CT	15 (83,3%)	3 (16,7%)	0,005
Homozigoto TT	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,564
rs9880018			
Homozigoto AA	1 (100,0%)	0 (0,0%)	-
Heterozigoto AG	17 (77,3%)	5 (22,7%)	0,011
Homozigoto GG	21 (80,8%)	5 (19,2%)	0,002
rs9848283			
Homozigoto AA	22 (84,6%)	4 (15,4%)	<0,001
Heterozigoto AG	13 (72,2%)	5 (27,8%)	0,059
Homozigoto GG	4 (80,0%)	1 (20,0%)	0,180

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Foi observada diferença nas frequências alélicas entre os polimorfismos estudados do gene *CLDN-1* apenas para o rs9848283 em relação ao grau de fibrose. Houve diferença estatisticamente significativa entre os alelos A e G para o rs9848283 em relação às frequências alélicas e os graus de fibrose ($p < 0,0001$) (Tabela 26).

Tabela 26. Frequência dos alelos dos polimorfismos do gene *CLDN-1* e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas

Alelos	Fibrose <15% n=39	Fibrose ≥15% n=10	p-val*	OR**	IC95%***
rs10212165					
A	0,684	0,650	0,766	1,114	0,65-2,06
G	0,316	0,350			
rs3909582					
A	0,487	0,600	0,155	0,641	0,36-1,12
G	0,513	0,400			
rs9865082					
C	0,766	0,812	0,603	1,273	0,64-2,52
T	0,234	0,188			
rs9880018					
A	0,237	0,250	1,000	0,947	0,50-1,80
G	0,763	0,750			
rs9848283					
A	0,731	0,650	<0,001	1,992	0,11-0,36
G	0,269	0,350			

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = "Odds Ratio"

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

5.5 SNPs DO GENE *CCL5*

A análise do polimorfismo do gene *CCL5* mostrou diferença significativa na distribuição apenas do genótipo CC entre os grupos de pacientes com as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas (31,4% vs. 68,6%, p=0,028) (Tabela 27).

Tabela 27. Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene *CCL5* e forma clínica em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	IND n=17	CD n=38	p-val*
rs2280789			
Homozigoto CC	11 (31,4%)	24 (68,6%)	0,028
Heterozigoto CT	5 (27,8%)	13 (72,2%)	0,059
Homozigoto TT	1 (50,0%)	1 (50,0%)	1,000

IND – Forma indeterminada

CD – Forma cardíaca

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

A análise da frequência dos alelos do polimorfismo do gene *CCL5* não revelou diferença entre os grupos estudados (Tabela 28).

Tabela 28. Frequência dos alelos do polimorfismo do gene *CCL5* e forma clínica em pacientes com doença de Chagas

Alelos	IND n=17	CD n=38	p-val*	OR**	IC95%***
rs2280789					
C	0,812	0,803	0,857	1,125	0,55-2,28
T	0,188	0,197			

IND – Forma indeterminada

CD – Forma cardíaca

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

Também não foi observada diferença entre a frequência dos genótipos e as frequências alélicas para este SNP entre os grupos com as formas cardíacas sem disfunção ventricular e com disfunção ventricular (Tabelas 29 e 30).

Tabela 29. Frequência dos genótipos do polimorfismo do gene *CCL5* e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	CSDV n=15	CCDV n=23	p-val*
rs2280789			
Homozigoto CC	10 (41,7%)	14 (58,3%)	0,414
Heterozigoto CT	5 (38,5%)	8 (61,5%)	0,405
Homozigoto TT	0 (0,0%)	1 (100,0%)	-

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Tabela 30. Frequência dos alelos do polimorfismo do gene *CCL5* e forma cardíaca em pacientes com doença de Chagas

Alelos	CSDV n=15	CCDV n=23	p-val*	OR**	IC95%***
rs2280789					
C	0,833	0,783	0,589	1,298	0,64-2,64
T	0,167	0,217			

CSDV – Forma cardíaca sem disfunção ventricular

CCDV – Forma cardíaca com disfunção ventricular

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

Houve associação entre o polimorfismo do gene *CCL5* e o grau de fibrose, o genótipo homocigoto CC foi mais frequentemente observado no grupo com fibrose <15% de fibrose (83,9% vs. 16,1%, $p < 0,001$) (Tabela 31).

Tabela 31. Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene *CCL5* e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas

Genótipo	Fibrose <15% n=39	Fibrose ≥15% n=10	p-val*
rs2280789			
Homocigoto CC	26 (83,9%)	5 (16,1%)	<0,001
Heterocigoto CT	12 (70,6%)	5 (29,4%)	0,090
Homocigoto TT	1 (100,0%)	0 (0,0%)	-

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os alelos do gene *CCL5* e o grau de fibrose (Tabela 32).

Tabela 32. Frequência dos alelos do polimorfismo do gene *CCL5* e grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas

Alelos	Fibrose <15% n=39	Fibrose ≥15% n=10	p-val*	OR**	IC95%***
rs2280789					
C	0,829	0,750	0,224	1,627	0,82-3,25
T	0,171	0,250			

*p-val = valor de p, considerando erro alfa de 5%

** OR = “Odds Ratio”

*** IC95% = intervalo de confiança de 95%

6 - DISCUSSÃO

A identificação de biomarcadores é importante para conhecer os mecanismos envolvidos na doença de Chagas e auxiliar no manejo clínico dos pacientes afetados. No presente trabalho foi observada associação entre polimorfismos dos genes *LGALS3*, *SOCS3*, *IL-28B*, *CLDN-1* e *CCL5* e as formas clínicas da doença de Chagas e o percentual de fibrose cardíaca em pacientes cronicamente infectados pelo *T. cruzi*. Até o presente momento nenhum estudo anterior correlacionou os polimorfismos estudados neste trabalho com as diferentes formas da infecção chagásica e o grau de fibrose no coração.

Os genótipos CA dos polimorfismos do gene *LGALS3* (rs4644 e rs4652); AG e GG do *SOCS3* (rs4969170); CT e TT do *IL-28B* (rs12979860 e 8099917, respectivamente); AG, AG, CC, AG e AG do *CLDN-1* (rs10212165, rs3909582, rs9865082, rs9880018 e rs9848283, respectivamente); e CC do *CCL5* (rs2280789) foram estatisticamente mais frequentes em pacientes com a forma cardíaca do que com a forma indeterminada da doença. Com relação ao grau de fibrose, os genótipos CC dos polimorfismos do gene *LGALS3* (rs4644 e rs4652); AA do *SOCS3* (rs4969170); CC do rs12979860 e TT do rs8099917 do *IL-28B*; AA do rs10212165, AA, AG e GG do rs3909582, CC e CT do rs9865082, AG e GG do rs9880018 e AA do rs9848283 do gene *CLDN1*; e CC do *CCL5* (rs2280789) foram estatisticamente mais frequentes em indivíduos com fibrose cardíaca <15% quando comparados com o grupo com fibrose ≥15%.

Quase oito milhões de pessoas são afetadas pela doença de Chagas em todo o mundo. Em 70% dos pacientes, o curso clínico da doença é benigno, contudo alguns pacientes podem evoluir para a cardiomiopatia chagásica crônica, levando à insuficiência cardíaca e morte súbita. Embora os mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento da doença de Chagas ainda não estejam completamente elucidados, proteínas, citocinas e quimiocinas podem exercer papéis importantes na patogênese.

A história natural da doença é constituída por uma fase aguda e uma fase crônica. A primeira é caracterizada por uma reação inflamatória aguda e elevada parasitemia circulante. Os indivíduos infectados podem permanecer assintomáticos por muitos anos, na chamada forma indeterminada da doença ou evoluírem para uma das formas crônicas da doença: cardíaca, digestiva ou mista. A forma cardíaca é a mais grave da doença de Chagas e a principal causa de morte dos indivíduos afetados. No

presente trabalho os polimorfismos para diferentes genes foram estudados em pacientes com a infecção chagásica nas formas indeterminada e cardíaca para avaliar o perfil genético desses indivíduos e a associação entre o polimorfismo dos genes *LGALS3*, *SOCS3*, *IL-28B*, *CLDN1* e *CCL5* e a evolução da doença e o grau de fibrose cardíaca.

Os estudos de dois polimorfismos do gene *LGALS3* (rs4644 e rs4652) revelaram que para ambos houve uma prevalência estatisticamente significativa de indivíduos heterozigóticos CA com a forma cardíaca da doença em comparação com pacientes com a forma indeterminada. A associação com o genótipo heterozigoto e não com os homozigotos foi inesperada, pois não foi observada uma correlação com nenhum dos alelos. O resultado encontrado pode ser devido ao pequeno tamanho da amostra, que gera desvios na análise estatística ou ao fato de não haver uma associação direta entre os genótipos e a doença, que provavelmente não está associada a um perfil populacional distinto.

Não há dados na literatura correlacionando os polimorfismos do *LGALS3* e a doença de Chagas. Entretanto, estudos sobre o câncer de mama e o desenvolvimento da função cognitiva em pacientes idosos revelaram que o alelo A do rs4644 é o alelo de risco para o desenvolvimento das doenças (BALAN et al., 2008; TROMPET et al., 2012).

Soares e cols. (2010) demonstraram a elevação na expressão de diversos marcadores, entre eles galectina-3 no coração de camundongos chagásicos crônicos. Considerando que a secreção de galectina-3 está associada com o desenvolvimento de inflamação e fibrose, é esperado que na cardiomiopatia chagásica crônica, que está associada a alterações na função cardiovascular, ao tônus vascular, a homeostasia e a reatividade plaquetária, haja aumento dos níveis dessa proteína (FATOR et al., 1985; PETKOVA et al. 2001; TANOWITZ et al 1992; TANOWITZ et al 1996). Diante disso, a heterozigose para ambos os polimorfismos da galectina-3 estudados pode ser um marcador genético do agravamento do quadro clínico dos pacientes com doença de Chagas, visto que o genótipo CA esteve associado à forma crônica mais grave da doença, a cardiomiopatia chagásica.

Observamos associação estatisticamente significativa entre os genótipos AG e GG do polimorfismo do gene *SOCS3* (rs4969170) e a forma cardíaca da doença de Chagas em relação à forma indeterminada. A análise das frequências alélicas revelou que associação entre o alelo A e a forma indeterminada da doença nos pacientes

cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, sugerindo que este biomarcador pode ser mais extensamente estudado em pacientes com doença de Chagas.

Apesar de não existirem estudos sobre esse polimorfismo e doença de Chagas, outros trabalhos mostraram associação deste SNP com doenças tais como hepatite C e o desenvolvimento de diabetes em indivíduos infectados com o vírus da hepatite C (ANGELO et al., 2013; ZHENG et al., 2013). Na hepatite C as proteínas virais parecem ser capazes de induzir a expressão de moléculas de SOCS3 e estas, por sua vez, regulam negativamente a via JAK-STAT importante nas respostas antivirais e antiproliferativas (ANGELO et al., 2013; BODE et al., 2003).

O mecanismo de ação das proteínas SOCS3 na doença de Chagas não foi completamente elucidado, mas essas moléculas parecem ter importância crucial na homeostase cardíaca (YASUKAWA et al., 2012). Elas podem regular a ativação de macrófagos, essenciais na resposta do hospedeiro contra o *T. cruzi*. Essas citocinas regulam negativamente a via de sinalização JAK-STAT, que tem papéis cardioprotetores e, por esse motivo, podem influenciar processos como hipertrofia ventricular e insuficiência cardíaca, importantes em pacientes com cardiomiopatia chagásica (GRADMAN; ALFAYOUMI, 2006; YASUKAWA et al., 2012).

Para o gene *IL-28B* também foi observada relação entre os genótipos e forma clínica em pacientes com doença de Chagas. Com relação ao rs12978960 houve diferença estatisticamente significativa de pacientes heterozigotos CT entre os indivíduos com a forma cardíaca em relação aos que apresentavam a forma indeterminada. Assim como ocorreu para as análises dos SNPs do gene da gelectina, para o rs12979860 do *IL-28B*, a associação com o genótipo heterozigoto não era esperada, já que dificulta a correlação entre os genótipos e as formas clínicas. Podem ter contribuído para este resultado mutações na população, de forma que não há associação entre os grupos populacionais e as forma clínicas da doença ou o pequeno número de amostras utilizadas nas análises.

Para o rs8099917 do gene *IL-28B* o genótipo TT foi significativamente mais frequente também no grupo com a forma mais grave da doença, a forma cardíaca. Curiosamente a análise das frequências alélicas não mostrou diferenças estatisticamente significantes em relação a este polimorfismo, o que pode ser decorrente do reduzido número de amostras analisadas, já que pode gerar desvios nos resultados da análise estatística.

Nossos resultados não estão em concordância ao observado para estes polimorfismos em estudos com pacientes portadores da hepatite C. De acordo com Cavalcante e cols. (2012) os genótipos protetores foram o CC do rs12979860 e o TT do rs8099917, pois estiveram associados à resposta virológica sustentada em pacientes portadores do vírus da hepatite C. Na hepatite o IL-28B pode exercer atividades antivirais importantes por agir pela via de sinalização JAK-STAT, assim como os IFNs do tipo I (DONNELLY; KOTENKO, 2010).

Na doença de Chagas, apesar da ausência de estudos acerca do papel do IL-28B, sabe-se que esta citocina pode atuar na polarização Th1/Th2, principalmente pela redução na secreção de citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13 e inibição da expressão de GATA3, um indutor do fenótipo Th2 (DAI et al., 2009; JORDAN et al., 2007a; SRINIVAS et al., 2008). Dessa forma, o processo patológico desencadeado pelo *T. cruzi* pode ser afetado pela citocina IL-28B, influenciando o desenvolvimento das diferentes formas clínicas nos pacientes com doença de Chagas.

Todos os polimorfismos estudados do gene *CLDN-1* apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os genótipos e as formas clínicas. Para os rs10212165, rs3909582, rs9880018 e rs9848283 o genótipo AG foi mais frequente na forma cardíaca do que na forma indeterminada. Para o SNP rs9865082 o genótipo homozigoto CC também foi mais frequente em pacientes com a forma cardíaca em relação aos pacientes com a forma indeterminada. A análise das frequências alélicas, por sua vez, demonstrou que para o rs10212165 o alelo A foi mais frequentemente encontrado em pacientes com a forma indeterminada, demonstrando associação protetora em relação à doença de Chagas.

Apesar de não existirem estudos sobre os polimorfismos do gene *CLDN-1* e doença de Chagas, nosso resultado não está em concordância ao encontrado para hepatite C, segundo o qual o alelo G do rs10212165 é o alelo protetor para a doença (BEKKER et al., 2010). Na hepatite o mecanismo que envolve a entrada do vírus da hepatite C nos hepatócitos ainda não está completamente compreendido e as proteínas claudinas podem estar envolvidas neste processo (BEKKER et al., 2010). Na doença de Chagas ainda não há estudos acerca do papel destas proteínas na infecção pelo *T. cruzi*, mas as claudinas podem participar das reações desencadeadas pelo parasito no hospedeiro.

O *CLDN-1* parece ter um papel importante nas respostas inflamatórias. Já foi descrito que citocinas pró-inflamatórias podem induzir a expressão dessa proteína em

diversas doenças (FUGITA et al., 2011; LIU et al., 2012; WEBER et al., 2008). Por outro lado, em modelo murino de Tripanossomíase Africana, a expressão de CLDN-1 foi aumentada com a secreção de citocinas anti-inflamatórias (BOSSCHE et al., 2012). Sabendo que as respostas Th1/Th2 são cruciais na doença de Chagas e que as citocinas do tipo Th2 aumentam a expressão de CLDN-1, esta proteína pode ter papel importante na infecção chagásica e atuar com marcador genético nesta doença (BASSO, 2013; BENEDETTO et al., 2011).

No presente trabalho para o polimorfismo rs2280789 do gene *CCL5*, houve maior frequência de indivíduos CC na forma indeterminada do que da forma cardíaca da doença de Chagas. Dessa forma, este genótipo é protetor em relação à doença. Os estudos dos polimorfismos para o gene *CCL5* em pacientes com anemia falciforme, doença de Chagas e infarto do miocárdio não demonstraram associações estatisticamente significantes (FLÓREZ; MARTÍN; GONZÁLEZ 2012; KALAI et al., 2013; TERESHCHENKO et al., 2012).

A expressão de *CCL5* é induzida por citocinas como IFN- γ e TNF- α na doença de Chagas (ALIBERTI et al., 2001; HARDISON et al 2006b). O *CCL5* parece estar envolvido com a presença de células inflamatórias tanto na fase aguda quanto na fase crônica e, nesta última, os seus efeitos ocorrem mesmo com o declínio nos níveis das citocinas pró-inflamatórias. Guedes e cols. (2010) observaram que em cães cronicamente infectados com *T. cruzi*, houve maior expressão do RNA mensageiro de *CCL5* no grupo de animais com a forma cardíaca quando comparado com o grupo com a forma indeterminada da doença.

O envolvimento cardíaco é a forma mais grave da doença de Chagas ocorrendo em 30-40% dos pacientes infectados. Uma das manifestações mais significativas da cardiopatia chagásica crônica é a fibrose, que está associada a infiltrados inflamatórios e cardiomiócitos em degeneração. A acumulação progressiva de colágeno intersticial interfere na conformação normal do miocárdio, levando a perda na sincronia das contrações ventriculares durante a sístole e contribuindo para o desenvolvimento de disfunções ventriculares (ALBANESI et al., 1998). No presente trabalho os diferentes polimorfismos foram correlacionados com o percentual de fibrose no miocárdio em pacientes com doença de Chagas. Não há evidências deste tipo de associação em estudos anteriores.

Para os SNPs rs4644 e rs4652 do gene *LGALS3*, os genótipos homozigotos CC estiveram significativamente associados com a menor porcentagem de fibrose cardíaca,

contudo não é possível dizer qual o genótipo protetor, pois todos os pacientes homocigotos AA foram mais frequentes no grupo com <15% de fibrose. Em 2008, Balan e cols. verificaram que o alelo A do rs4644 estava associado com o fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama em indivíduos caucasianos e asiáticos. Além disso, foi visto que o aumento na expressão do alelo A, que codifica o aminoácido histidina, esteve envolvido com maior expressão de galectina e consequentemente inibição da apoptose e indução da proliferação de células tumorais. Apesar destes dados estarem relacionados a outras doenças, os nossos resultados estão de acordo com a literatura, ou seja, o CC é o genótipo protetor.

A secreção de galectina-3 está associada à inflamação, cicatrização, fibrose e remodelamento cardíaco, condições características da cardiopatia chagásica crônica. Já foi visto que a infusão desta proteína em fibroblastos cardíacos de ratos normais *in vivo* resultou em aumento significativo da proliferação dos fibroblastos e consequentemente na produção de colágeno (SHARMA et al., 2004). Além disso, o tratamento com células da medula óssea reduziu a expressão de galectina-3, a inflamação e a fibrose nos corações de camundongos chagásicos crônicos (SOARES et al., 2011).

A análise do polimorfismo rs4969170 do gene *SOCS3* revelou que o genótipo homocigoto AA esteve estatisticamente mais frequente no grupo com fibrose <15% quando comparado com o grupo com fibrose $\geq 15\%$, sugerindo o papel protetor deste genótipo. Esse dado está em concordância ao observado para as análises das formas clínicas, para as quais os genótipos AG e GG estiveram associados à forma mais grave da doença, ou seja, a forma cardíaca. Da mesma forma, a análise das frequências alélicas revelou que o alelo A foi o alelo protetor, pois foi significativamente mais frequente no grupo com a forma indeterminada da doença de Chagas.

A *SOCS3* é uma molécula importante no desenvolvimento de fibrose cardíaca. A *SOCS3* induz a apoptose, o dano mitocondrial e estresse oxidativo, inflamação e inibe a angiogênese (YASUKAWA et al., 2012). Oba e cols. (2012) verificaram que a deleção de *SOCS3* em cardiomiócitos reduz a formação de fibrose no coração em modelo de infarto agudo do miocárdio. Similarmente ao hipotetizado para o gene *LGALS3*, podemos também supor que o genótipo AA do gene *SOCS3* pode resultar em diminuição da produção desta citocina e menor grau de fibrose.

Assim como o *SOCS3*, o *IL-28B* pode afetar o desenvolvimento de fibrose cardíaca pela atuação na via de sinalização JAK-STAT (YASUKAWA et al., 2012). A análise das frequências genotípicas e alélicas do gene *IL-28B* mostrou associação com o

grau de fibrose em pacientes com doença de Chagas. Para o rs12978960, o genótipo CC esteve estatisticamente mais frequente no grupo com fibrose <15% quando comparado com o grupo com maior percentual fibrótico. Em concordância com este resultado, foi observado que para este SNP o alelo T foi mais frequente no grupo com maior percentual de fibrose cardíaca ($p=0,011$).

Para o rs8099917 do *IL-28B* o genótipo TT esteve associado ao menor percentual de fibrose. Este dado não era esperado, pois é oposto ao observado para as análises das formas clínicas da doença, uma vez que esse mesmo genótipo esteve estatisticamente mais frequente no grupo com a forma mais grave da doença, a forma cardíaca. Os resultados são conflitantes, pois talvez não haja uma associação entre este polimorfismo e a doença de Chagas ou devido a mutações no genoma das populações estudadas o que dificulta a associação, ou ainda pode ser decorrente do pequeno número de amostras utilizadas no trabalho.

Em um estudo com pacientes com doença hepática gordurosa não-alcoólica foi observado que o alelo C e o genótipo CC do rs12979860 foram protetores nestes pacientes (PETTA et al., 2012). Outros estudos não demonstraram associação entre os SNPs rs12979860 e rs8099917 do *IL-28B* e o desenvolvimento de fibrose em pacientes com hepatite C (MARABITA et al., 2011; NOUREDDIN et al., 2013; YOUSSEF et al., 2014). Foi observada associação entre os polimorfismos do *IL-28B* e a severidade da doença hepática, em termos de esteatose, atividade inflamatória e fibrose (PETTA et al., 2012).

A análise dos SNPs do gene *CLDN-1* mostrou associações com o percentual de fibrose cardíaca. Para os rs10212165, rs3909582, rs9880018 e rs9865082 não houve associação plausível, uma vez que todos os genótipos foram mais frequentemente encontrados no grupo com fibrose <15%. Para o genótipo rs9848283 o alelo A e o genótipo AA foram estatisticamente mais presentes em pacientes com fibrose <15%, demonstrando o papel protetor desse indicador.

Em modelo de tripanossomíase africana, a presença das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β (envolvida com o desenvolvimento de fibrose), resultou no aumento da expressão de *CLDN-1* (ARAÚJO-JORGE, 2002; ARAUJO-JORGE et al., 2008; BOSSCHE et al., 2012). Dessa forma, a expressão de *CLDN-1* pode estar associada ao desencadeamento do processo fibrótico nos pacientes. Este dado nos leva a supor que o genótipo AA do rs9848283 pode estar associado a menor secreção de CLDN-1.

A análise da distribuição dos genótipos do gene *CCL5* revelou que os indivíduos homocigotos CC estiveram significativamente mais presentes no grupo com fibrose <15% em relação ao grupo com fibrose \geq 15%.

Sabe-se que as quimiocinas da família CC estão envolvidas no controle da infecção pelo *T. cruzi*, aumentando a produção de óxido nítrico pelas células e induzido a fibrose nos tecidos; essas quimiocinas são cruciais no desenvolvimento do processo inflamatório no tecido cardíaco em indivíduos com doença de Chagas (MARINO et al., 2005). Foi visto ainda que o bloqueio do receptor de *CCL5* reduz a deposição de fibronectina e conseqüentemente o desenvolvimento de fibrose nos cardiomiócitos em camundongos chagásicos (MARINO et al., 2004).

Apenas o SNP rs12979860 do gene *IL-28B* mostrou uma associação com as formas cardíacas em pacientes com doença de Chagas. Para este polimorfismo, o alelo C foi estatisticamente mais presente em pacientes com a forma cardíaca sem disfunção quando comparados com os indivíduos com a forma cardíaca com disfunção ventricular.

No presente trabalho foi observado que para o SNP do gene *SOCS3* houve plausibilidade entre os polimorfismos e as formas clínicas e os graus de fibrose nos pacientes estudados. Para este SNP, houve uma prevalência de indivíduos AG e GG na forma mais grave da doença, a forma cardíaca, e o alelo A foi estatisticamente mais frequente no grupo com a forma indeterminada. A análise dos graus de fibrose revelou que os pacientes AA estiveram mais presentes no grupo com menor percentual de fibrose, revelando coerência destes dados. Vê-se, portanto, que o *SOCS3* pode ser um candidato a biomarcador na doença de Chagas.

Por outro lado, não houve correlação dos resultados obtidos para os SNPs da *galectina*. Enquanto os indivíduos heterocigotos foram mais frequentes na forma cardíaca da doença, a análise dos dados de fibrose cardíaca revelou que os homocigotos CC para ambos os polimorfismos foram mais frequentes no grupo com menor percentual de fibrose. Para os SNPs do *IL-28B* os dados também não foram razoáveis: enquanto os indivíduos CT do rs12979860 e TT do rs8099917 foram mais frequentemente encontrados no grupo com a forma cardíaca, os pacientes com os genótipos CC do rs12979860 e TT do rs8099917 estiveram mais presentes no grupo com <15% de fibrose cardíaca. O mesmo ocorreu para o *CCL5*, uma vez que os pacientes CC foram mais frequentes no grupo com a forma cardíaca e ao mesmo tempo no grupo com menor percentual de fibrose. Para os SNPs do *CLDNI* os resultados foram igualmente conflitantes.

A não concordância de alguns resultados descritos anteriormente pode ser decorrente da ausência de correlação entre estes polimorfismos e a doença de Chagas. Por outro lado, estes dados podem ainda ser devido a importantes limitações deste estudo. O tamanho pequeno da amostra restringe associação com fatores de risco entre os polimorfismos e o comprometimento cardíaco nos pacientes cronicamente infectados pelo *T. cruzi*. A ausência de um grupo controle para correlacionar com os pacientes com a doença dificulta associações importantes com os pacientes com doença de Chagas.

É necessário explorar as funções destes genes na infecção chagásica, tanto na fase aguda quanto na fase crônica. A ausência de estudos correlacionando os genes utilizados neste trabalho com a doença de Chagas dificulta as comparações e as inferências. A maioria dos dados encontrados sobre estes SNPs versa sobre hepatite, cujos mecanismos são distintos dos observados na infecção chagásica.

Com base nos resultados explicitados, torna-se evidente a necessidade de novas pesquisas para avaliar a expressão destas proteínas, o que pode auxiliar no entendimento dos processos envolvidos na infecção provocada pelo *T. cruzi*. Além disso, estes marcadores genéticos podem ser utilizados no futuro como biomarcadores para estadiamento e conduta terapêutica em pacientes com doença de Chagas em similaridade com o que já ocorre para outras doenças, como hepatite C e vários tipos de tumores, como melanoma, câncer colorretal, de pulmão e de mama.

7 - CONCLUSÕES

- Os genótipos CA dos polimorfismos do gene *LGALS3* (rs4644 e rs4652); AG e GG do *SOCS3* (rs4969170); CT e TT do *IL-28B* (rs12979860 e 8090017, respectivamente); AG, AG, CC, AG e AG do *CLDN-1* (rs10212165, rs3909582, rs9865082, rs9880018 e rs9848283, respectivamente); e CC do *CCL5* (rs2280789) foram estatisticamente mais frequentes em pacientes com a forma cardíaca do que na forma indeterminada da doença de Chagas;
- Os genótipos CC dos polimorfismos do gene *LGALS3* (rs4644 e rs4652); AA do *SOCS3* (rs4969170); CC no rs12979860 e TT no rs8090017 do *IL-28B*; AA no rs10212165, AA, AG e GG no rs3909582, CC e CT no rs9865082, AG e GG no rs9880018 e AA no rs9848283 do gene *CLDN1*; e CC do *CCL5* (rs2280789) foram estatisticamente mais frequentes em indivíduos com fibrose cardíaca <15% quando comparados com o grupo com fibrose ≥15%;
- O alelo A do SNP do gene *SOCS3* (rs4969170) mostrou associação protetora à forma clínica em pacientes com doença de Chagas, sendo mais prevalente em indivíduos com a forma indeterminada da doença;
- Para o rs12979860 do gene *IL-28B* o alelo T foi mais prevalente no grupo de pacientes com fibrose ≥15% relação ao grupo com fibrose <15%;
- O alelo C do SNP rs12979860 do gene *IL-28B* foi estatisticamente mais presente em pacientes com a forma cardíaca sem disfunção quando comparados com os indivíduos com a forma cardíaca com disfunção ventricular, revelando proteção em indivíduos com doença de Chagas.

8 - REFERÊNCIAS

- ABEL, L. C., et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Autoimmun.**, v. 17, n. 1, p. 99-107, 2001.
- ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V., et al. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 172, n. 1, p. 493-502, 2004.
- ALARCÓN DE NOYA, B. et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **J. Infect. Dis.**, v. 201, n. 9, p. 1308-1315, 2010.
- ALBANESI, F. M. Cardiomiopatas. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 71, n. 2, 1998.
- ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 503-529, 2004.
- ALIBERTI, J. C. S., et al. IL-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 1961-1967, 1996.
- ALIBERTI, J. C., et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 1433-1440, 2001.
- AL-QAHTANI, A. A., et al. Genetic variation in interleukin 28B and correlation with chronic hepatitis B virus infection in Saudi Arabian patients. **Liver Int.**, p. 1-8, 2013
- AMASHEH, M., et al. TNF -induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NF B signaling. **J. Cell Sci.**, v. 123, p. 4145-4155, 2010.
- ANDRADE, J. P., et al. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 97, n. 2, supl. 3, 2011.
- ANDRADE, S. G., et al. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* Infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitological cured mice. **Bull. World Health Org.**, v. 69, p. 191-197, 1991.
- ANGELO, A. L. D., et al. Myxovirus resistance, osteopontin and suppressor of cytokine signaling 3 polymorphisms predict hepatitis C virus therapy response in an admixed patient population: comparison with IL-28B. **Clinics**, v. 68, n. 10, p. 1325-1332, 2013.
- APPAY, V.; ROWLAND-JONES, S. L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. **TRENDS in Immunol.**, v. 22, n. 2, 2001.

ARAÚJO, A., et al. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 9-16, 2009.

ARAÚJO-JORGE, T. C., et al. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardopathy. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 12, p. 1823-1828, 2002.

ARAÚJO-JORGE, T. C., et al. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardopathy. **Cytokine Growth Factor Ver.**, v. 19, n. 5-6, p. 405-413, 2008.

AZEVEDO FILHO, C. F. **Avaliação da fibrose miocárdica pela ressonância magnética cardíaca na doença valvar aórtica grave: validação de um algoritmo de quantificação e comparação com a histopatologia**. 86 p. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Cardio-Pneumologia. São Paulo, 2009.

BALAN, V., et al. Racial disparity in breast cancer and functional germ line mutation in galectin-3 (rs4644): a pilot study. **Cancer Res.**, v. 68, n. 24, p. 10045-10050, 2008.

BARONDES, S.H., et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 20807–20810, 1994.

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World J. Exp. Med.**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2013.

BASTOS, C. J. C., et al. Clinical Outcomes of Thirteen Patients with Acute Chagas Disease Acquired through Oral Transmission from Two Urban Outbreaks in Northeastern Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 6, e711, 2010.

BAZAN, J. F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, n. 18, p. 6934–6938, 1990.

BEKKER, V., et al. Genetic Variation in CLDN-1 and Susceptibility to Hepatitis C Virus Infection. **J. Viral. Hepat.**, v. 17, n.3, p. 192–200, 2010.

BENEDETTO, A. D., et al. Tight Junction Defects in Atopic Dermatitis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 127, n. 3, p. 773–786, 2011.

BERAÚN, Y., et al. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) *loci* are not associated with Chagas' disease. **Tissue Antigens**, v. 52, p. 81–3, 1998.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **New Engl. J. Med.**, v. 364, p. 2527–2534, 2011.

BILLIAU, A. Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 17, p. 381–409, 2006.

BJORBAEK, C., et al. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. **Mol. Cell**, v. 1, p. 619-625, 1998.

- BODE, J. G., et al. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. **FASEB J.**, v. 17, p. 488–490, 2003.
- BOER, R. A., et al. Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. **Ann. Med.**, v. 43, p. 60–68, 2011.
- BOLLI, R.; DAWN, B. ; XUAN, Y. T. Role of the JAK-STAT pathway in protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 13, p. 72-79, 2003.
- BOSSCHE, J. V. D., et al Claudin-1, Claudin-2 and Claudin-11 Genes Differentially Associate with Distinct Types of Anti-inflammatory Macrophages In vitro and with Parasite- and Tumour-elicited Macrophages In vivo. **Scand. J. Immunol.**, v. 6, n. 75, p. 588-598, 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010. **Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais**, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Doença de Chagas**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530. Acesso em: 08 dez 2013.
- BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J.R. (Org.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, p. 177–186, 1999.
- CALIFICE, S.; CASTRONOVO, V.; VAN DEN BRULE, F. Galectin-3 and cancer. **Int. J. Oncol.**, v. 25, p. 983–992, 2004.
- CALZADA, J. E., et al. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. **Tissue Antigens**, v. 58, p. 154–158, 2001.
- CAMARGO, M.M., et al. Glycosylphosphatidylinositol anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of pro-inflammatory cytokines by macrophages. **J. Immunol.**, v. 158, p. 5890–5901, 1997.
- CAVALCANTE, L. N., et al. IL-28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. **Liver Int.**, v. 32, n. 3, p. 476-486, 2012.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- CHAGAS, C. Tripanomíase Americana. Forma aguda da moléstia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 37-65, 1916.

CHIBA, H., et al. The significance of interferon-gamma-triggered internalization of tight-junction proteins in inflammatory bowel disease. **Sci. STKE**, v. 316, pe1, 2006.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, suppl. S12—S15, 2010.

COLOBRAN, R., et al. The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 148, p. 208–217, 2007.

CORRÊA-DE-SANTANA, E., et al. Hypothalamus–pituitary–adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. **J. Neuroimmunol.**, v. 173, p. 12 – 22, 2006.

COSSIO, P. M., et al. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. **Circulation**, v. 50, n. 6, p. 1252-1259, 1974.

COSTA, G. C., et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **J. Infect. Dis.**, v. 199, p. 451–454, 2009.

COSTA, J.; LORENZO, M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104(I), p. 46-51, 2009.

COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 1, 2003.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, suppl. 1, 2007.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, suppl. 1, 2009.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, suppl. S6—S7, 2010.

CRAWFORD, A., et al. A Role for the Chemokine RANTES in Regulating CD8 T Cell Responses during Chronic Viral Infection. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 7, e1002098, 2011.

CRIADO, L., et al. Genetic polymorphisms in TNFA/ TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. **Cytokine**, v. 57, p. 398–401, 2012.

CROKER, B. A.; KIU, H.; NICHOLSON, S. E. SOCS Regulation of the JAK/STAT Signalling Pathway. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 19, n. 4, p. 414–422, 2008.

CUTRULLIS, R. A., et al. Timing of Expression of Inflammatory Mediators in Skeletal Muscles from Mice Acutely Infected with the RA Strain of *Trypanosoma cruzi*. **Pathobiology**, v. 76, p. 170–180, 2009.

DAI, J., et al. IFN-11 (IL-29) inhibits GATA3 expression and suppresses Th2 responses in human naive and memory T cells. **Blood**, v. 113, n. 23, p. 5829-5838, 2009

- DHAWAN P., et al. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 1765–1776, 2005.
- DHIRAPONG, A., et al. The immunological potential of galectin-1 and -3. **Autoimmun. Rev.**, v. 8, p. 360–363, 2009.
- DI MAGLIANO, M. P.; LOGSDON, C. D. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. **Gastroenterology**, v. 144, n. 6, p. 1220-1229, 2013.
- DIAS, J. C. Globalization, inequity and Chagas disease. **Cad. Saúde Publ.**, v. 23, Suppl 1: S13-22, 2007.
- DIAS, J. C. P.; COURA; J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997.
- DIEU, M. C., et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 373–386, 1998.
- DONLON, T. A., et al. Localization of a Human T-Cell-Specific Gene, RANTES (D17S136E), to Chromosome 17q11.2-q12. **Genomics**, v. 6, p. 548-553, 1990.
- DONNELLY, R. P., et al. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. **J. Leukoc. Biol.**, v. 2, n. 76, p. 314–321, 2004.
- DONNELLY, R.P., et al. Interferon-lambda and therapy for chronic hepatitis C virus infection. **Trends Immunol.**, v. 32, n. 9, p. 443–450, 2011
- DONNELLY, R. P.; DICKENSHEETS, H.; O'BRIEN, T. R. Interferon-lambda and therapy for chronic hepatitis C virus infection. **Trends Immunol.**, v. 32, n. 9, p. 443–450, 2011.
- DONNELLY, R. P.; KOTENKO, S. V. Interferon-Lambda: A New Addition to an Old Family. **J. Interferon & Cytokine Res.**, v. 30, n. 8, 2010.
- DRIGO, S. A., et al. Lack of association of tumor necrosis factor- α polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. **Immunol. Lett.**, v. 108, p. 109–111, 2007.
- DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: An open-ended story. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1760, p. 616–635, 2006.
- DUTRA, W.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 12, p. 581-587. 2005.
- ELOLA, M. T., et al. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 64, p. 1679–1700, 2007.
- EMILSSON, V., et al. Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. **FEBS Lett.**, v. 455, p. 170-174, 1999.

ESCUADERO-ESPARZA, A.; JIANG, W. G.; MARTIN, T. A. The Claudin family and its role in cancer and metastasis. **Front Biosci.**, v. 16, p. 1069–1083, 2011.

ESPER, L., et al. Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute Chagas disease. **Am. J. Pathol.**, v. 181, p. 130–140, 2012.

ESTRABAUD, E., et al. Genomics and HCV infection: Progression of fibrosis and treatment response. **J. Hepatol.**, v. 57, p. 1110–1125, 2012.

FACTOR, S. M., et al. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, p. 246–253, 1985.

FAVRE, H., et al. Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. **FEBS Lett.**, v. 453, p. 63–66, 1999.

FERREIRA, R. C., et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 407–411, 2003.

FINDLEY, M. K.; KOVAL, M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. **IUBMB Life**, v. 61, n. 4, p. 431–437, 2009.

FLÓREZ, O.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ, C. I. Interleukin 4, interleukin 4 receptor-a and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. **Parasite Immunol.**, v. 33, p., n. 9, 506–511, 2011.

FLÓREZ, O.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ, C. I. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. **Human Immunol.**, v. 73, p. 852–858, 2012.

FUJITA, H., et al. Claudin-1 expression in airway smooth muscle exacerbates airway remodeling in asthmatic subjects. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 127, p. 1612–1621, 2011.

FURUSE, M., et al. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v. 143, p. 391–401, 1998a.

FURUSE, M., et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. **J. Cell Biol.**, v. 141, p. 1539–1550, 1998b.

FURUSE, M., et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. **J. Cell Biol.**, v. 156, p. 1099–1111, 2002.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol. Today**, v. 8, p. 240–244, 1991.

GARCIA, S., et al. Treatment with Benznidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. **Antimicrobial Agents Chemoth.**, v. 49, n. 4, p. 1521–1528, 2005.

GE, D., et al. Genetic variation in IL-28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, v. 461, p. 399–401, 2009.

GEORGE, P. M., et al. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. **Pharmacol. & Therap.**, v. 135, p. 44–53, 2012.

GIBBONS, R. J., et al. The quantification of infarct size. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 44, p. 1533-42, 2004.

GOMES, J. A., et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 7960-7966, 2005.

GRADMAN, A. H.; ALFAYOUMI, F. From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 48, p. 326-341, 2006.

GUEDES, P. M. M., et al. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in Beagle dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 138, p. 106–113, 2010.

GUEDES, P. M. M., et al. Antiparasitological chemotherapy in Chagas' disease cardiomyopathy: current evidence. **Trop. Med. Int. Health**. v. 17, n. 9, p. 1057–1065, 2012.

GYLVIN, T., et al. Mutation analysis of suppressor of cytokine signalling 3, a candidate gene in Type 1 diabetes and insulin sensitivity. **Diabetologia**, v. 47, n. 7, p. 1273-1277, 2004.

HADJ-RABIA, S., et al. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. **Gastroenterology**, v. 127, p.1386-1390, 2004

HARADA, M., et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. **Nat. Med.**, v. 11, p. 305-411, 2005.

HARDISON, J. L., et al. The CC Chemokine Receptor 5 Is Important in Control of Parasite Replication and Acute Cardiac Inflammation following Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 1, p. 135–143, 2006a.

HARDISON, J. L., et al. The Chemokines CXCL9 and CXCL10 Promote a Protective Immune Response but Do Not Contribute to Cardiac Inflammation following Infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 125–134, 2006b.

HELMAN, D., et al. Cytokine-inducible SH2 protein (CIS3) and JAK2 binding protein (JAB) abolish prolactin receptor-mediated STAT5 signaling. **FEBS Lett.**, v. 441, p. 287-91, 1998.

HENDERSON, N. C., et al. Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 103, n. 13, p. 5060-5, 2006

HENDERSON, N. C., et al. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. **Am. J. Pathol.**, v. 172, p. 288–298, 2008.

HENDERSON, N. C. ; SETHI, T. The regulation of inflammation by galectin-3. **Immunol. Rev.**, v. 230, n. 1, p. 160-71, 2009.

HIGUCHI, M. L., et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiov. Res.**, v. 60, p. 96–107, 2003.

HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution, **Glycobiology**, v. 3, p. 297–304, 1993.

HIRATA, A., et al. Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 48, p. 176-184, 2006.

HIROTA, H., et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. **Cell**, v. 97, p. 189–198, 1999.

HOVSEPIAN, E., et al. IL-10 Inhibits the NF- κ B and ERK/MAPK-Mediated Production of Pro-Inflammatory Mediators by Up-Regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes. **PLoS ONE**, n. 8, v. 11, e79445, 2013.

HUGHES, R. C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding family proteins. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1473, p. 172–185, 1999.

HUGHES, R.C. Galectins as modulators of cell adhesion. **Biochimie**, v. 83, p. 667–676, 2001.

HUNTER C.A.; SLIFER T.; ARAUJO F.G. Interleukin-12- mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 2381–2386, 1996.

IHLE, J. N. The Stat family in cytokine signaling. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, p. 211-7, 2011.

ISOMAKI, P., et al. The expression of socs is altered in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 46, n. 10, p. 1538–1546, 2007.

JANNINI, J; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, suppl.1, 2007.

JARVIS, G. A., et al. Galectin-3C: Human Lectin for Treatment of Cancer. In: Klyosov, A. A.; Traber, P. G. **Galectins and Disease Implications for Targeted Therapeutics**, Norcross: American Chemical Society, 2012.

JORDAN, W. J., et al. Human interferon lambda-1 (IFN- λ 1//IL-29) modulates the Th1//Th2 response. **Genes Immun.**, v. 8, p. 254-261, 2007a.

JORDAN, W. J., et al. Modulation of the human cytokine response by interferon lambda-1 (IFN-11/IL-29). **Genes and Immun.**, v. 8, p. 13–20, 2007b.

KALAI, M., et al. Frequency of three polymorphisms of the CCL5 gene (rs2107538, rs2280788 and rs2280789) and their implications for the phenotypic expression of sickle cell anemia in tunisia. **Pol. J. Pathol.**, v. 2, p. 84-89, 2013.

KIM, H., et al. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. **Cell Biol. Int.**, v. 31, p. 655–662, 2007.

KIRCHHOFF, L. V. Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). **Adv. Parasitol.**, v. 75, p. 1-18, 2011.

KLESHCHENKO, Y. Y., et al. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human artery smooth muscle cells. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 6717–6721, 2004.

KODAMA, H., et al. Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, activates the Jak/ STAT pathway in rat cardiomyocytes. **Circ. Res.**, v. 81, p. 656-663, 1997.

KOLLMAR, R., et al. Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 10196-10201, 2001.

KOTENKO, S. V., et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10R-beta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 receptor complexes. **J. Biol. Chem.**, v. 4, n. 2764, p. 2725–2732, 2001.

KOTENKO, S. V., et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 69–77, 2003.

KRAUSE, G., et al. Structure and function of claudins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, p. 631-645, 2008.

KRZEŚLAK, A.; LIPÍŃSKA, A. Galectin-3 as a multifunctional protein. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v. 9, n. 2, p. 305-328, 2004.

KUNISADA, K., et al. Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes. **Circulation**, v. 98, p. 346–352, 1998.

LANDER, E.S., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 860–921, 2001.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 46, n. 2, p. 473-529, 1948.

LEOTLELA, P. D., et al. Claudin-1 overexpression in melanoma is regulated by PKC and contributes to melanoma cell motility. **Oncogene**, v. 26, p. 3846–3856, 2007.

- LI, M. O., et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 99-146, 2006.
- LI, W., et al. Regulation of apoptosis by type III interferons. **Cell Prolif.**, v. 41, p. 960–979, 2008.
- LIU, F. T.; PATTERSON, R. J.; WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1572, p. 263–273, 2002.
- LIU, Y., et al. Anti-apoptotic effect of claudin-1 on TNF- α -induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. **Tumour Biol.**, v. 33, n. 6, p. 2307-2315, 2012.
- LOETSCHER, P., et al. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. **J. Immunol.**, v. 156, p. 322–327, 1996.
- LOPUŠNÁ, K., et al. Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. **Acta Virol.**, v. 57, p. 171 – 179, 2013.
- MACAMBIRA, S. G., et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. **The FASEB Journal**, v. 23, p. 3843-3050, 2009.
- MACHADO, F. S., et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, v. 102, p. 3003–3008, 2000.
- MACHADO, F. S., et al. CCR5 Plays a Critical Role in the Development of Myocarditis and Host Protection in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.**, v. 191, p. 627–36, 2005.
- MACHADO, F. S., et al. Chagas Heart Disease: Report on Recent Developments. **Cardiol. Rev.**, v. 20, n. 2, p. 53-65, 2012.
- MAGALHÃES-SANTOS, I. F.; ANDRADE, S. G. Participation of cytokines in the necrotic-inflammatory lesions in the heart and skeletal muscles of *Calomys callosus* infected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 555–561, 2005.
- MAGUIRE, J. H. Chagas' disease - - can we stop the deaths? **N. Engl. J. Med.**, v. 355, n. 8, p. 760-761, 2006.
- MALMGAARD, L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 24, n. 8, p. 439–454, 2004.
- MARABITA F., et al. Genetic variation in the interleukin-28B gene is not associated with fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and known date of infection. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 1127-1134, 2011.
- MARINE, J. C., et al. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. **Cell**, v. 98, p. 617-627, 1999.

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

MARIN-NETO, J. A., et al. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). **Am. Heart J.**, v. 156, n. 1, p. 37-43, 2008.

MARINO, A. P. M. P., et al. Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES) Antagonist (Met-RANTES) Controls the Early Phase of *Trypanosoma cruzi*-Elicited Myocarditis. **Circulation**, v. 110, p. 1443-1449, 2004.

MARINO, A. P. M. P., et al. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, suppl. I, p. 93-96, 2005.

MARTIN, P., et al. KRAS mutations as prognostic and predictive markers in non-small cell lung cancer. **J. Thorac. Oncol.**, v. 8, n. 5, p. 530-542, 2013.

MATOS-SOUZA, J. R.; FRANCHINI, K. G.; NADRUZ-JUNIOR, W. Hipertrofia ventricular esquerda: o caminho para a insuficiência cardíaca . **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 15, n. 2, p. 71-74, 2008.

MAVADDAT, N., et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 105, n. 11, p. 812-822, 2013.

MCCULLOUGH, P. A., et al. Confirmation of a heart failure epidemic: findings from the resource utilization among congestive heart failure (REACH) study. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 39, p. 60-9, 2002.

MCCULLOUGH, P. A.; OLOBATOKE, A.; VANHECKE, T. E. Galectin-3: a novel blood test for the evaluation and management of patients with heart failure. **Rev. Cardiovasc. Med.**, v. 12, p. 200-210, 2011.

MENON-MIYAKE, M. A., et al . Efeitos da *Luffa operculata* sobre o epitélio do palato de rã: aspectos histológicos. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 71, n. 2, 2005.

MILL, J. G.; VASSALLO, D. V. Hipertrofia cardíaca. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, p. 63-75, 2001.

MILLER, M.D.; KRANGEL, M.S. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 12, n. 1-2, p. 17-46, 1992.

MINATOBUCHI, S. et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. **Circulation**, v. 109, p. 2572-2580, 2004.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, supl. 1, July 2009.

MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS Lett.**, v. 470, n. 3, p. 305-8, 2000.

MOORE, K. W., et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683–765, 2001.

MORIN, P. J. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. **Cancer Res.**, v. 65, p. 9603-9606, 2005.

MORRIS, S. A., et al. Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. **Circulation**, v. 82, p. 1900–1909, 1990.

MOSMANN, T. R. & SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v. 17, p. 138-146, 1996.

MURPHY, P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 593-633, 1994.

NADRUZ, W.; FRANCHINI, K. G. Influência de fatores ambientais e genéticos na hipertrofia e remodelamento cardíacos na hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, v. 8, p. 414-424, 2001.

NAGAJYOTHI, F., et al. *Trypanosoma cruzi* Infection of Cultured Adipocytes Results in an Inflammatory Phenotype. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 9, p. 1992–1997, 2008.

NANGIA-MAKKER, P., et al. Galectin-3 cleavage: a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers. **Cancer Res.**, v. 67, p. 11760–11768, 2007.

NAVRATILOVA, Z. Polymorphisms in CCL2 & CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 150, n. 2, p. 191–204, 2006.

NELSON, P. J.; PATTISON, J. M.; KRENSKY, A. M. Rantes. In: MIRE-SLUIJS, A. R.; THORPE, R. **Cytokines: Handbook of Immunopharmacology**. California: Academic Press, p. 433–448, 1998.

NELSON, P.J., et al. Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. **J. Immunol.**, v. 151, n. 5, p. 2601-12, 1993.

NICOLA, N. A. Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. **Stem Cells**, v. 12, p. 3-12, 1994.

NOGUEIRA, L. G., et al. Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 10, e1867, 2012.

NOUREDDIN, M., et al. Association of IL-28B genotype with fibrosis progression and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C: A longitudinal analysis. **Hepatology**, v. 58, n. 5, p. 1548-1557, 2013.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, p. 477-487, 2008.

OBA, T., et al. Cardiac-Specific Deletion of SOCS-3 Prevents Development of Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 59, n. 9, 2012.

OBANA, M., et al. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. **Circulation**, v. 121, p. 684-91, 2010.

OLIVARES-VILLAGOMEZ, D., et al. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 563-570, 1998.

OLIVEIRA, S. A., et al. Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. **Cytotherapy**, v. 14, n. 3, p. 339-349, 2012.

PENNICA, D., et al. Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 92, p. 1142-1146, 1995.

PESTKA, S., et al. Interleukin-10 and Related Cytokines and Receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 929-979, 2004.

PETKOVA, S. B., et al. The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 499-511, 2001.

PETTA, S., et al. IL-28B and PNPLA3 polymorphisms affect histological liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **J. Hepatol.**, v. 56, n. 6, p. 1356-1362, 2012.

PEZET, A., et al. Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 24497-24502, 1999.

PINTO, A. Y. N., et al. Serious acute chagas disease autochthonous from Brazilian Amazon. **Rev. Para. Med.**, v. 21, n. 2, p. 7-12, 2007.

PRASAD, S., et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. **Lab. Invest.**, v. 85, p. 1139-1162, 2005.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2011.

RABINOVICH, G.A., et al. Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. **J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 383–393, 1999.

RABINOVICH, G.A., et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends Immunol.**, v. 23, p. 313–320, 2002.

RACHID, M. A., et al. Role of endothelin receptors in the control of central nervous system parasitism in *Trypanosoma cruzi* infection in rats. **J. Neuroimmunol.**, v. 220, p. 64–68, 2010.

RAIMOND, J., et al. Mapping of the galectin-3 gene (LGALS3) to human chromosome 14 at region 14q21–22. **Mamm. Genome**, v. 8, p. 706–707, 1997.

RAKSHIT, D. S., et al. Wear debris inhibition of anti-osteoclastogenic signaling by interleukin-6 and interferon-gamma mechanistic insights and implications for periprosthetic osteolysis. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 88, n. 4, p. 788–799, 2006.

RASSI-JUNIOR, A; RASSI, A; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388–402, 2010.

RATNER, E. S., et al. A KRAS variant is a biomarker of poor outcome, platinum chemotherapy resistance and a potential target for therapy in ovarian cancer. **Oncogene**, v. 31, n. 42, p. 4559–66, 2012.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Heredity**, v. 86, p. 248–249, 1995.

REIS, P. P., et al. Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 113, p. 3169–3180, 2008.

REYNOLDS, G. M., et al. Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue. **Hepatology**, v. 47, p. 418, 2008.

RIBEIRÃO, M., et al. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Parasite Immunol.**, v. 22, n. 1, p. 49–53, 2000.

RIBEIRO, A. L.; ROCHA, M. O. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, n. 3, p. 301–314, 1998.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., et al. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, v. 175, p. 29–39, 1992.

RIBEIROS-DOS-SANTOS, R., et al. Cell Therapy in Chagas Cardiomyopathy (Chagas Arm of the Multicenter Randomized Trial of Cell Therapy in Cardiopathies Study): A Multicenter Randomized Trial. **Circulation**, v. 125, p. 2454–2461, 2012.

ROBERTS, A.W., et al. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 98, p. 9324-9329, 2001.

RONCAROLO, M. G., et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 28-50, 2006.

ROT, A., et al. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1489-1495, 1992.

SADOWSKI, C. L., et al. Insulin induction of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA expression in C2C12 skeletal muscle cells is mediated by STAT5a. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 20703-20710, 2001.

SANO, H., et al. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 389-397, 2003.

SCHALL, T. J., et al. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. **Nature**, v. 347, p. 669-671, 1990.

SCHMUNIS, G. A. Enfermedad de Chagas em un mundo global. In: SILVEIRA, A. C. (editor). **La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral**. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud/ Fundación Mundo Sano, p. 251-66, 2007.

SCHNEEBERGER, E. E.; LYNCH, R. D. The tight junction: a multifunctional complex. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 286, p. C1213-1228, 2004.

SCHORK, N. J.; FALLIN, D.; LANCHBURY, S. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. **Clin. Genet.**, v. 58, p. 250-264, 2000.

SCHROEN, B., et al. Thrombospondin-2 is essential for myocardial matrix integrity: increased expression identifies failure-prone forms of cardiac hypertrophy. **Circ. Res.**, v. 95, p. 515-522, 2004.

SHARMA, U. C., et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. **Circulation**, v. 110, p. 3121-3128, 2004.

SHASTRY, B. S. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. **J. Hum. Genet.**, v. 52, p. 871-880, 2007.

SHENG, Z., et al. Cardiotrophin-1 inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 5783-5791, 1997.

SHEPPARD, P., et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 63-68, 2003.

SHIKANAI-YASUDA, M. A., et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 33, n. 5, Oct. 1991.

SIEBERT, J. C.; WALKER, E. B. Monitoring cytokine profiles during immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 2, n. 6, p. 799–816, 2010.

SILVA, J. S., et al. Interleukin-10 and interferon-regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, v. 175, p. 169–174, 1992.

SILVA J. S., et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice by inducing nitric oxide production in infected IFN- γ -activated macrophages. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4862–4867, 1995.

SILVA, A. A., et al. *Trypanosoma cruzi* triggered meningoencephalitis is a CCR1/CCR5-independent inflammatory process. **J. Neuroimmunol.**, v. 184, p. 156–163, 2007.

SOARES, M. B. P., et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **Am. J. Pathol.**, 164, p. 441–447, 2004.

SOARES, M. B. P., et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. **J. Infect. Dis.**, v. 202, n. 3, p. 416–426, 2010.

SOARES, M. B. P., et al. Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. **Cell Cycle**, v. 10, n. 9, p. 1448–1455, 2011.

SOARES, M. B. P.; 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.**, v. 73, p. 547–559, 2001.

SORIA, G.; BEN-BARUCH, A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. **Cancer Letters**, v. 267, p. 271–285, 2008.

SOUZA, S. M., et al. Dogs infected with the blood trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* display an increase expression of cytokines and chemokines plus an intense cardiac parasitism during acute infection. **Mol. Immunol.**, v. 58, p. 92–97, 2014.

SRINIVAS, S., et al. Interferon- κ (interleukin-29) preferentially down-regulates interleukin-13 over other T helper type 2 cytokine responses *in vitro*. **Immunology**, v. 125, p. 492–502, 2008.

STARK, G. R. ; DARNELL, J. E. The JAK-STAT pathway at twenty. **Immunity**, v. 36, p. 503–14, 2012.

STEED, E.; BALDA, M. S.; MATTER K. Dynamics and functions of tight junctions. **Trends Cell Biol.**, v. 20, p. 142–149, 2010.

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina. **Braz. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 60, p. 25-32, 2008.

SUGIYAMA, M., et al. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, e26620, 2011.

TALVANI, A., et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 851–866, 2000.

TALVANI, A., et al. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas Disease. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 214-220, 2004.

TANOWITZ, H. B., et al. Chagas' disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 400–419, 1992.

TANOWITZ, H. B., et al. Compromised microcirculation in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Parasitol.**, v. 82, p. 124–130, 1996.

TEDELIND, S., et al. Interferon-gamma down-regulates claudin-1 and impairs the epithelial barrier function in primary cultured human thyrocytes. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 149, p. 215–221, 2003.

TEIXEIRA, P. C., et al. Pathogenesis of Chagas disease cardiomyopathy. **World J. Clin. Infect. Dis.**, v. 2, n. 3, p. 39-53, 2012

TERESHCHENKO, I. P., et al. CCL5/RANTES Gene Polymorphisms in Slavonic Patients with Myocardial Infarction. **Mediators Inflamm.**, v. 52569, 2011.

TOLLET-EGNELL, P., et al. Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. **Endocrinology**, v. 140, p. 3693-3704, 1999.

TORRES, O. A., et al. Lack of association between IL-6 -174G/C gene polymorphism and Chagas disease. **Tissue Antigens**, v. 76, p. 131–134, 2010a.

TORRES, O. A., et al. Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, p. 682–685, 2010b.

TROMPET, S., et al. Genetic variation in galectin-3 gene associates with cognitive function at old age. **Neurobiology of Aging**, v. 33, p. 2232.e1–2232.e9, 2012.

UELLENDAHL, M. **Detecção de fibrose miocárdica pela ressonância magnética cardiovascular em portadores de doença de Chagas: correlação com as formas clínicas e prognóstico.** 75 p. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Cardio-Pneumologia. São Paulo, 2007.

VAN KIMMENADE, R. R., et al. Utility of aminoterminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. **J Am. Coll. Cardiol.**, v. 48, p. 1217–1224, 2006.

VASCONCELOS, J. F., et al. Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces immunomodulation, recruitment of T regulatory cells, reduction of myocarditis and decrease of parasite load in a mouse model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **The FASEB Journal**, v. 27, p. 4691-4702, 2013.

VENTER, J.C., et al. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, p. 1304–1351, 2001.

VILAS-BOAS, F., et al. Transplante de células da medula óssea na insuficiência cardíaca chagásica: relato da primeira experiência humana. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 96, n. 4, 2011.

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: role of cell surface galactose residues. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 119, p. 228–235, 1984.

VIOTTI, R., et al. Long-term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus no treatment. **Ann. Intern. Med.**, v. 144, p. 724-734, 2006.

VON LUETTICHAU, I., et al. RANTES chemokine expression in normal and diseased tissue. **Cytokine**, v. 8, n. 1, p. 89-98, 1996.

VRAY, B., et al. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. **Glycobiology**, v. 7, p. 647–657, 2004.

WADA, J.; MAKINO, H. Galectins, galactoside-binding mammalian lectins: clinical application of multi-functional proteins. **Acta Med. Okayama**, v. 55, p. 11–17, 2001.

WALSH, S. V.; HOPKINS, A. M.; NUSRAT, A. Modulation of tight junction structure and function by cytokines. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 41, p. :303–313, 2000.

WEBER, C. R., et al. Claudin-1 and claudin-2 expression are elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. **Lab. Invest.**, v. 10, n. 88, p. 1110–1120, 2008.

WHITE, G. E., et al. Suppressor of cytokine signalling protein SOCS3 expression is increased at sites of acute and chronic inflammation. **J. Mol. Hist.**, v. 42, p. 137–151, 2011.

WILL, C.; FROMM, M.; MÜLLER, D. Claudin tight junction proteins: novel aspects in paracellular transport. **Peritoneal Dialysis Int.**, v. 28, p. 577–584, 2008.

WITT, D. P.; LANDER, A. D. Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. **Curr. Biol.**, v. 4, n. 5, p. 394-400, 1994.

WITTE, K., et al. IL-28A, IL-28B, and IL-29: Promising cytokines with type I interferon-like properties. **Cytokine & Growth Factor**, v. 21, p. 237–251, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Fact sheet N°340. March 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas Disease: Control and Elimination**. World Health Organization. World Health Assembly report. Geneva: World Health Organization, p. 1–4, 2010.

YAMAUCHI-TAKIHARA, K. gp130-mediated pathway and heart failure. **Future Cardiol.**, v. 4, p. 427-37, 2008.

YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 13, p. e17–e39, 2008.

YASUKAWA, H., et al. SOCS3: A novel therapeutic target for cardioprotection. **JAK-STAT**, v. 1, n. 4, p. 234-240, 2012.

YASUKAWA, H.; SASAKI, A.; YOSHIMURA, A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p.143-164, 2000.

YOON, C. H., et al. Claudin-1 acts through c-Abl-protein kinase Cdelta (PKCdelta) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 226–233, 2010.

YOSHIDA, N., et al. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 1663–1667, 1989.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T. KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 454–465, 2007.

YOUSSEF, S. S., et al. Association of IL-28B Polymorphism with Fibrosis, Liver Inflammation, Gender Respective Natural History of Hepatitis C Virus in Egyptian Patients with Genotype 4. **J. Interf. Cytokine Res.**, v. 34, n. 1, p. 22-27, 2014.

ZADORI, G. et al. Examination of Claudin-1 Expression in Patients Undergoing Liver Transplantation Owing to Hepatitis C Virus Cirrhosis. **Transplant. Proc.**, v. 43, p. 1267–1271, 2011.

ZAFRA, G., et al. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. **Microbes Infect.**, v. 9, n. 9, p. 1049-1052, 2007.

ZHENG, Y. Y., et al. Association of suppressor of cytokine signalling 3 polymorphisms with insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. **J. Viral Hepat.**, v. 20, n. 4, p. 273-280, 2013.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasites ou vários parasitas da doença de Chagas? **Rev. Biol.**, v. 6b, p. 44-48, 2011.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121-127, 2000.

ZOU, Y., et al. Leukemia inhibitory factor enhances survival of cardiomyocytes and induces regeneration of myocardium after myocardial infarction. **Circulation**, v. 108, p. 748-753, 2003.

9 - ANEXO I

GUIMARÃES, E. T.; CRUZ, G. S.; ALMEIDA, T. F.; SOUZA, B. S.; KANETO, C. M.; VASCONCELOS, J. F.; SANTOS, W. L.; SANTOS, R. R.; VILLARREAL, C. F.; SOARES, M. B. Transplantation of stem cells obtained from murine dental pulp improves pancreatic damage, renal function, and painful diabetic neuropathy in diabetic type 1 mouse model. **Cell Transplant**, v. 22, n. 12, p, 2345-2354, 2013. doi: 10.3727/096368912X657972. Epub 2012 Oct 12.