

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA**

ROMERO HENRIQUE TEIXEIRA VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOCINAS
NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA**

RECIFE

2014

ROMERO HENRIQUE TEIXEIRA VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOCINAS
NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Yara de Miranda Gomes

Co-orientadora: Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

RECIFE

2014

Catlogação na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- V331a Vasconcelos, Romero Henrique Teixeira.
Avaliação de polimorfismos genéticos de citocinas na doença de Chagas crônica / Romero Henrique Teixeira Vasconcelos. - Recife: [s.n.], 2014.
80 p. : ilus.
Tese (doutorado em saúde pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo cruz.
Orientadora: Yara de Miranda Gomes.
Co-orientadora: Clarice Neuenschwander Lins Morais.
1. Doença de Chagas. 2. Polimorfismo genético. 3. Citocinas. 4. Interleucina-10 5. Fator de Necrose Tumoral-alfa I. Gomes, Yara de Miranda. II. Morais, Clarice Neuenschwander Lins. II. Título.

ROMERO HENRIQUE TEIXEIRA VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOCINAS
NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data de aprovação: 30 de Janeiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dra. Yara de Miranda Gomes (Orientadora)
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Zulma Maria de Medeiros (Membro Interno)
Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues (Membro Externo)
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (Membro Externo)
Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro (Membro Externo)
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

A Vovó Berenice (*in memoriam*),
que sempre desejou ter um doutor na família.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz e, por toda a infraestrutura que foi disponibilizada para a realização desta tese, desde os equipamentos e reagentes, até o transporte que foram de bastante auxílio para execução da mesma.

Ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Saúde Pública, em especial as duas coordenadoras do Doutorado enquanto fui aluno, Eduarda Cesse e Ana Brito, não só pelo suporte acadêmico, mas também por todo apoio e amparo que me foram dados, levarei comigo saudades das aulas e das reuniões.

As minhas orientadoras, Clarice Moraes e Yara Gomes, primeiro por terem me aceitado como seu aluno, mas principalmente, pelos ensinamentos, orientações, conselhos e até puxões de orelha, dados com bastante carinho, desde a elaboração do projeto até a finalização da tese. Serei eternamente grato e terei muito orgulho de ter sido orientado por vocês.

À equipe da Secretaria Acadêmica, em especial a Ana Paula, Joselice, Rivaldete e Viviane, que sempre foram atenciosas e prestativas para resolver os mais diversos assuntos acadêmicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudos a mim concedida durante a realização do curso.

Aos colegas do Doutorado (Turma 2010-2014), em especial as amigas Andrea Santos Lima e Lígia Maria Ferreira, pelos momentos que compartilhamos, aulas, seminários, conversas, preocupações, desabafos e comemorações de artigos aceitos que tornaram esses anos de aprendizado ainda mais prazerosos.

À equipe do Ambulatório de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco, em especial a médica Glória Melo, pelo auxílio que foi dado na seleção dos indivíduos participantes do estudo.

Aos indivíduos portadores da doença de Chagas que participaram deste estudo, que sempre fizeram as idas ao Ambulatório serem, acima de tudo, um momento de aprendizado.

A minha família, em especial a minha mãe, Eulalia Maria, e ao meu irmão, Rafael Gustavo, pelo apoio e incentivo, essenciais para eu ter chegado até aqui, e principalmente pelo amor, que sempre me fez chegar em casa e conseguir esquecer os problemas acadêmico-científicos.

Aos meus amigos do Colégio Damas, em especial a Yú Queiroz, Daniel Senna e Beatriz Braga, e aos da turma de Biomedicina 2007.1 da Universidade Federal de Pernambuco, em especial a Bruna Luna e Nathalia Alencar, pelo incentivo e pelos momentos de convivência, reais e “virtuais”, que fizeram nossa amizade permanecer a mesma até hoje.

Aos meus queridos Cleber Albuquerque, Diogo Castelo Branco, Diogo Chalegre, Leonardo Aquino, Marcos Almeida, Pablo Gualberto e especialmente ao meu amor Hugo Firmino por serem grandes torcedores do meu sucesso acadêmico e profissional. Sei que cada linha dessa tese tem grande parte do incentivo de vocês. Vocês foram bastante importantes nos momentos que queria descansar a mente, e mais ainda quando ficavam preocupados com a execução do projeto e elaboração da tese. Não há como agradecer esse amor que sinto de vocês.

Aos amigos do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Simone Santos, Edeneide Xavier, Karla Luna, Eduardo Henrique, Suellen Braz, Aletheia Sampaio, Sheilla Oliveira e especialmente a Marina Souza pela agradável convivência diária, principalmente nas “conversas nos corredores”.

Ao agradecer aos amigos da Imunologia, tenho que fazer um agradecimento especial e exclusivo as “Tuberculettes”, todas as estudantes de iniciação ou pós-graduação, técnicas e colaboradoras do Laboratório de Imunopidemiologia que me “adotaram” como “agregado”. É merecimento de vocês minha motivação para ir ao CPqAM, pois sempre encontrei um ambiente alegre, divertido e, sobretudo, bastante afetuoso. Muito obrigado, suas falsas! Agradeço especialmente a Lílian Montenegro, que primeiro me incluiu no “grupo” e hoje sei que essa amizade, sempre sincera e intensa, perdurará fraternalmente e cientificamente.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, em especial Anna Lígia, Maria Ribeiro e Sávio Vieira, que acompanharam de perto as preocupações e alegrias na execução dos experimentos. Além de tornarem o ambiente de trabalho super agradável.

Meu maior agradecimento e mais que especial é para Elisa de Almeida, minha estagiária de Iniciação Científica durante a execução deste estudo, e que depois se tornou uma colaboradora ao concluir sua graduação. Foi um prazer e um orgulho orientá-la e dividir com ela grande parte desta tese. Ter sua companhia, seu empenho, sua dedicação e, principalmente, sua amizade foram essenciais para a finalização deste trabalho.

*“Brilhar,
esta é a minha vocação,
e de minha geração,
somos incomuns”*

(Nizan Guanaes e PC Bernandes)

VASCONCELOS, Romero Henrique Teixeira. **Avaliação de polimorfismos genéticos de citocinas na doença de Chagas crônica**. 2014. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

A doença de Chagas é largamente distribuída pelo continente americano, onde afeta milhões de indivíduos. Clinicamente, apresenta uma diversidade de manifestações. Na fase crônica, os indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* podem ser assintomáticos ou apresentar complicações cardíacas e/ou digestivas. Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento e manutenção das formas clínicas crônicas da infecção chagásica. A produção e a expressão diferencial de algumas citocinas entre os portadores da doença de Chagas crônica tornaram estas moléculas alvos de estudos de polimorfismos genéticos. O presente estudo teve o objetivo de avaliar polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em portadores da doença de Chagas crônica. Foram avaliados os SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* em uma população de portadores da doença de Chagas crônica selecionada no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco. Participaram desse estudo, 256 indivíduos, sendo 66 assintomáticos e 190 com cardiopatia chagásica crônica. A população estudada foi composta em sua maioria por mulheres idosas. Dentre as comorbidades presentes, a hipertensão arterial sistêmica foi a mais prevalente. A genotipagem dos SNPs foi realizada através de reação em cadeia da polimerase em tempo real com sondas TaqMan a partir de DNA genômico obtido de amostras de sangue periférico de cada indivíduo. Não foram observadas diferenças na distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos SNPs estudados entre as formas clínicas da doença de Chagas crônica. Também não foram observadas diferenças na distribuição das frequências genotípicas e alélicas do SNP -1082G/A do gene *IL-10* entre portadores de cardiopatia chagásica crônica. No entanto, observou-se um maior percentual, estatisticamente significativo, do genótipo GA e do alelo A do SNP -308G/A do gene *TNF- α* nos portadores de cardiopatia chagásica leve, o que sugere que esse SNP pode atuar como um fator de proteção no desfecho da cardiopatia chagásica crônica.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Polimorfismo Genético, Citocinas, Interleucina-10, Fator de Necrose Tumoral alfa

VASCONCELOS, Romero Henrique Teixeira. **Evaluation of cytokines genetic polymorphisms in chronic Chagas disease.** 2014. Thesis (Doctor Degree in Public Health) – Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2014.

ABSTRACT

Chagas disease is widely distributed through the American continent, where affects millions of individuals. Clinically, the disease presents a variety of manifestations. In the chronic phase, the individuals infected by *Trypanosoma cruzi* may have the absence of symptomatology or present cardiac and/or digestive complications. Several studies have demonstrated the involvement of the immune response in the development and maintenance of chronic clinical forms of chagasic infection. The differential production and expression of some cytokines among patients with chronic Chagas disease became these molecules targets of genetic polymorphisms studies. The present study aimed to evaluate single nucleotide polymorphisms (SNPs) in patients with chronic Chagas disease. The SNPs -1082G/A of IL-10 gene and -308G/A of TNF- α gene were assessed in a population of patients with chronic Chagas disease selected in the Outpatients of Chagas Disease and Heart Failure of Pernambuco. Two hundred fifty six individuals participated in this study, 66 asymptomatic and 190 with chronic chagasic cardiomyopathy. The study population was composed mostly by elderly women. Among the comorbidities studied, Systemic Arterial Hypertension was the most prevalent. Genotyping of SNPs was performed by real time polymerase chain reaction with TaqMan probes from genomic DNA obtained from peripheral blood samples of each individual. No differences in distribution of genotypic and allelic frequencies of the SNPs studied between clinical forms of chronic Chagas disease were observed. Also, no differences in the distribution of genotypic and allelic frequencies of SNP -1082G/A of IL-10 gene among patients with chronic chagasic cardiomyopathy were observed. However, there was a higher percentage, statistically significant, of the GA genotype and A allele of SNP -308G/A of TNF- α gene in patients with mild chronic chagasic cardiomyopathy, suggesting that this SNP may act as a protective factor in the outcome of chronic chagasic cardiomyopathy.

Key words: Chagas disease, Genetic Polymorphism, Cytokines, Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor-alpha

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estimativa do número de imigrantes infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> em países não endêmicos.....	17
Figura 2	Ciclo de vida do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro humano e no inseto vetor.....	19
Figura 3	Evolução clínica da doença de Chagas humana.....	21
Figura 4	Citocinas e células envolvidas na resposta imune da doença de Chagas crônica.....	26
Figura 5	Princípio da extração de DNA genômico.....	37
Figura 6	Princípio da discriminação alélica por PCR em tempo real.....	39
Figura 7	Curvas de amplificação de discriminação alélica por PCR em tempo real.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características epidemiológicas de portadores de doença de Chagas crônica atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE.....	42
Tabela 2	Características clínicas de portadores de doença de Chagas crônica atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE.....	43
Tabela 3	Comparação das Frequências Genotípicas e Alélicas do SNP -1082G/A do gene <i>IL-10</i> do presente estudo e de demais estudos realizados em Pernambuco.....	45
Tabela 4	Comparação das Frequências Genotípicas e Alélicas do SNP -308G/A do gene <i>TNF-α</i> do presente estudo e de demais estudos realizados em Pernambuco.....	45
Tabela 5	Frequências Genotípica e Alélica do SNP -1082G/A do gene <i>IL-10</i> em portadores de doença de Chagas crônica atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE.....	46
Tabela 6	Frequências Genotípica e Alélica do SNP -308G/A do gene <i>TNF-α</i> em portadores de doença de Chagas crônica atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CARD	Forma Cardíaca
CD	Grupamento de Diferenciação
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
CRA	Antígeno Repetitivo Citoplasmático
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FEVE	Fração de Ejeção Ventricular Esquerda
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
FRA	Antígeno Repetitivo Flagelar
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HPV	Papilomavírus Humano
IC	Intervalo de Confiança
IFN- γ	Interferon- <i>gama</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IND	Forma Indeterminada
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PROCAPE	Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco
SNP	Polimorfismo de Único Nucleotídeo
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento- <i>beta</i>
Th	Linfócito T auxiliar
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- <i>alfa</i>
UPE	Universidade de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Epidemiologia da doença de Chagas	17
2.2 Mecanismos de Transmissão da doença de Chagas	19
2.3 Manifestações Clínicas da doença de Chagas	20
2.4 Diagnóstico Laboratorial da doença de Chagas	22
2.5 Tratamento da doença de Chagas	23
2.5.1 Tratamento Etiológico.....	23
2.5.2 Tratamento Sintomático.....	24
2.6 Imunopatogênese da doença de Chagas	24
2.7 Marcadores Imunológicos de Evolução da doença de Chagas	26
2.8 Polimorfismos de Único Nucleotídeo (SNPs)	28
2.8.1 Genotipagem de SNPs.....	29
2.9 SNPs em Genes de Citocinas	30
2.9.1 SNPs no gene <i>IL-10</i>	31
2.9.2 SNPs no gene <i>TNF-α</i>	31
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo Geral	33
4.2 Objetivos Específicos	33
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	34
5.1 Etapas e Desenho do Estudo	34
5.2 Local do Estudo	34
5.3 População de Estudo	35
5.4 Definição dos Grupos de Estudo	35
5.5 Amostra de Estudo	36
5.6 Considerações Éticas	36
5.7 Obtenção e Processamento das Amostras	36
5.8 Análise Molecular	37
5.8.1 Extração e Purificação de DNA Genômico.....	37
5.8.2 Avaliação da Concentração e Pureza das Amostras de DNA.....	38
5.8.3 Determinação dos Genótipos dos SNPs.....	38
5.9 Análise Estatística	40

6 RESULTADOS.....	41
6.1 Características epidemiológicas e clínicas da população de estudo.....	41
6.2 Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene <i>IL-10</i> e -308G/A do gene <i>TNF-α</i> nos portadores da doença de Chagas crônica.....	44
6.3 Análise comparativa das frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene <i>IL-10</i> e -308G/A do gene <i>TNF-α</i> no estado de Pernambuco.....	44
6.4 Associação das frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene <i>IL-10</i> e -308G/A do gene <i>TNF-α</i> com as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas crônica e com a gravidade da cardiopatia chagásica.....	46
7 DISCUSSÃO.....	48
7.1 Características epidemiológicas e clínicas da população de estudo.....	48
7.2 Avaliação dos SNPs -1082G/A do gene <i>IL-10</i> e -308G/A do gene <i>TNF-α</i>.....	51
8 CONCLUSÕES.....	59
9 PERSPECTIVAS.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICE A – Artigo Publicado.....	72
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente Chagásico..	78
APÊNDICE C – Formulário de Pesquisa.....	79
ANEXO A - Parecer de Aprovação do CEP-CPqAM/Fiocruz.....	80

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, descrita em 1909 pelo pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, Carlos Chagas, é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que persiste como um problema de saúde pública na América Latina. Estima-se que 12 milhões de pessoas estariam infectadas e que 14 mil mortes ocorrem anualmente pela doença (HOTEZ *et al.* 2007; RASSI Jr. *et al.*, 2010). As manifestações da doença são caracterizadas por uma curta fase aguda, seguida de uma longa fase crônica, durante a qual 70% dos indivíduos permanecem assintomáticos, enquanto que os 30% restantes apresentam formas graves com alterações cardíacas e/ou digestivas. Os mecanismos responsáveis pela susceptibilidade à infecção e o desenvolvimento das formas sintomáticas da doença de Chagas crônica permanecem não completamente esclarecidos (DUTRA *et al.*, 2005).

Tem sido sugerido que fatores genéticos do hospedeiro humano, fatores ambientais e a variabilidade entre os isolados de *T. cruzi* seriam os principais determinantes da prevalência da doença e de suas manifestações (CRUZ-ROBLES *et al.*, 2004). O fato de que apenas uma parte da população que vive em áreas endêmicas torna-se infectada e que apenas um terço dos infectados desenvolvem os sintomas, reforça o papel dos fatores genéticos do hospedeiro na susceptibilidade e desenvolvimento da doença (WILLIAMS-BLANGERO *et al.*, 2003).

Diversos estudos relatam prováveis marcadores de susceptibilidade genética para a doença de Chagas crônica. Alguns abordaram a relação entre genes do complexo principal de histocompatibilidade e a susceptibilidade à doença (DEGHAIDE *et al.*, 1998; LAYRISSE *et al.*, 2000; LLOP *et al.*, 1988; NIETO *et al.*, 2000), enquanto outros relataram o papel de genes que codificam citocinas e quimiocinas na determinação da susceptibilidade aumentada, e no desenvolvimento da forma crônica cardíaca (CALZADA *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2009; RAMASAWMY *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ-PEREZ *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2009). No entanto, a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* e o desenvolvimento das formas crônicas cardíaca e/ou digestiva é complexa e heterogênea e provavelmente envolve vários genes, cada um com diferentes graus de contribuição sobre a patogênese da doença.

Os marcadores de susceptibilidade genética mais frequentemente avaliados são os polimorfismos de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNP), onde uma base nitrogenada do Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid* - DNA) é substituída por outra. A seleção natural favoreceu a introdução de SNPs em todo o genoma humano, que podem resultar em variações na produção e no nível de uma proteína ou em alterações na sua sequência de aminoácidos (OLLIER, 2004).

O conceito de que a susceptibilidade ou a progressão de uma doença infecciosa ou parasitária seja determinada por pequenas diferenças genéticas entre os indivíduos expostos vem ganhando força ao longo dos anos, visto que muitas delas podem apresentar-se com diferentes formas clínicas e/ou com diferentes níveis de gravidade (OLLIER, 2004). No caso da infecção pelo *T. cruzi*, o espectro de expressão clínica da doença varia desde portadores assintomáticos até cardiopatas com falha cardíaca grave ou a formação de megaesôfago e/ou megacólon. Estas seriam fortes evidências da influência de fatores genéticos do hospedeiro na susceptibilidade diferencial à doença de Chagas (WILLIAMS-BLANGERO *et al.*, 2003).

O grupo de pesquisa em doença de Chagas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/Fiocruz), trabalha há cerca de dez anos em colaboração com o Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do Pronto Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco (PROCAPE) da Universidade de Pernambuco (UPE), com diversas abordagens sobre a infecção humana pelo *T. cruzi*. Uma das principais linhas de pesquisa do grupo tem o intuito de avaliar marcadores biológicos de diferenciação entre as formas clínicas crônicas da doença de Chagas (BRAZ *et al.*, 2013; LORENA *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2010; VERÇOSA *et al.*, 2007).

O estabelecimento de marcadores biológicos baseados na resposta imune vem sendo desenvolvido com sucesso pelo grupo e alguns possíveis preditores de evolução/progressão para as formas mais graves estão sendo avaliados. Um dos objetivos mais recentes do referido grupo de pesquisa é avaliar marcadores genéticos que possam ser associados com as formas clínicas crônicas da doença de Chagas e com a gravidade das mesmas. Neste contexto, se inseriu esta tese, que teve o intuito de iniciar a avaliação de SNPs em genes de citocinas em indivíduos portadores da doença de Chagas crônica, associando as variantes alélicas com as diferentes formas clínicas. Com isso será possível monitorar a progressão da patologia chagásica naqueles indivíduos que apresentem variantes alélicas mutantes para as citocinas estudadas. O acompanhamento específico de cada indivíduo pelos médicos, de acordo com seu genótipo, poderá trazer inovações na terapia, como a administração de citocinas ou de seus bloqueadores, com o intuito de atenuar a progressão para as formas mais graves, melhorando sua qualidade, já que o acompanhamento atual visa apenas diminuir a progressão dos sintomas, quando os mesmos já estão presentes, com mudanças nos hábitos de vida ou correções cirúrgicas.

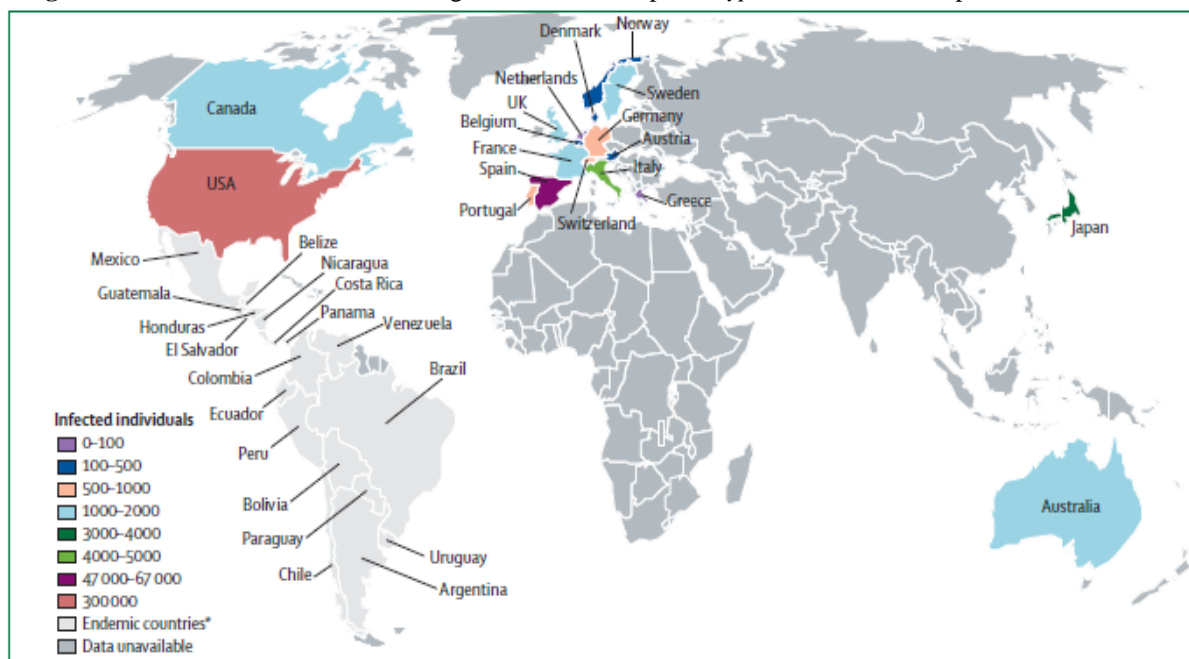
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia da doença de Chagas

Apesar de já ter completado um centenário de sua descrição e de muitos avanços terem sido realizados no seu combate, principalmente o controle vetorial, a doença de Chagas ainda representa um problema de saúde pública na América Latina, onde é endêmica. Segundo estimativa de Dias *et al.* (2008), a prevalência da infecção pelo *T. cruzi* é de 12 milhões de casos e aproximadamente 28 milhões de pessoas estariam sob o risco de contrair a infecção.

A doença de Chagas constituiu por vários anos, desde sua descrição, uma endemia predominantemente rural, de distribuição exclusiva nas Américas, atingindo áreas específicas, intimamente associadas ao subdesenvolvimento social e econômico (SCHMUNIS, 2007). Migrações para áreas urbanas durante as três últimas décadas do século XX mudaram o padrão epidemiológico tradicional, passando ser a doença também uma endemia urbana. Problemas econômicos e políticos nos países endêmicos também estimulam a migração e favorecem a propagação da doença para os países desenvolvidos (PIRON *et al.*, 2008). Atualmente, a doença de Chagas é considerada um problema de saúde pública mundial, com diversos casos notificados em países considerados não endêmicos, como Espanha e Estados Unidos (Figura 1), dentre outros destinos dos imigrantes latinos (RASSI Jr. *et al.*, 2010).

Figura 1 - Estimativa do número de imigrantes infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em países não endêmicos.



Fonte: Rassi Jr. *et al.* (2010).

O Brasil iniciou, em 1950, o Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas. Em meados dos anos 80, com o programa consolidado, o impacto foi positivo, com redução dos índices triatomínico-tripanosômicos, do número de jovens infectados, estabeleceu-se um rigoroso controle transfusional, e, conseqüentemente, a prevalência da infecção baixou. Em 2006, o Brasil recebeu uma certificação da Organização Pan-Americana da Saúde relativa à eliminação da transmissão da doença pelas vias vetorial e transfusional (DIAS, 2006).

Com o sucesso das medidas adotadas para seu controle, estima-se que atualmente o Brasil possua de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002). A prevalência da infecção pelo *T. cruzi* no Brasil seria inferior a 0,2%, sendo o perfil do portador da doença de Chagas o de um indivíduo adulto, de origem rural, de baixo nível instrucional e vivendo em centros urbanos (DIAS, 2007).

A mortalidade precoce causada pela doença de Chagas é um dos grandes problemas desta endemia e resulta numa grande perda econômica. No Brasil, entre 1979 e 1981, foram gastos cerca de 300 milhões de dólares com portadores da doença, segundo estimativa baseada no número de casos no período (MONCAYO, 2003). Entre 1999 e 2007 foram notificados, no país, 54 mil óbitos pela doença, o que representa cerca de 6 mil mortes anuais. A maioria dos óbitos ocorreu em indivíduos do sexo masculino e idosos (MARTINS-MELO *et al.*, 2012). Apesar de ser observar uma diminuição dos óbitos pela doença na população brasileira, o Nordeste não segue esse padrão. Braz *et al.* (2011) chamam atenção para o aumento do número de óbitos no Nordeste e para o aumento do número de casos agudos nessa região. No entanto, os autores atribuem essa elevação de relatos de doença de Chagas aguda devido à inclusão desta forma da doença no sistema de notificação compulsória em 2003.

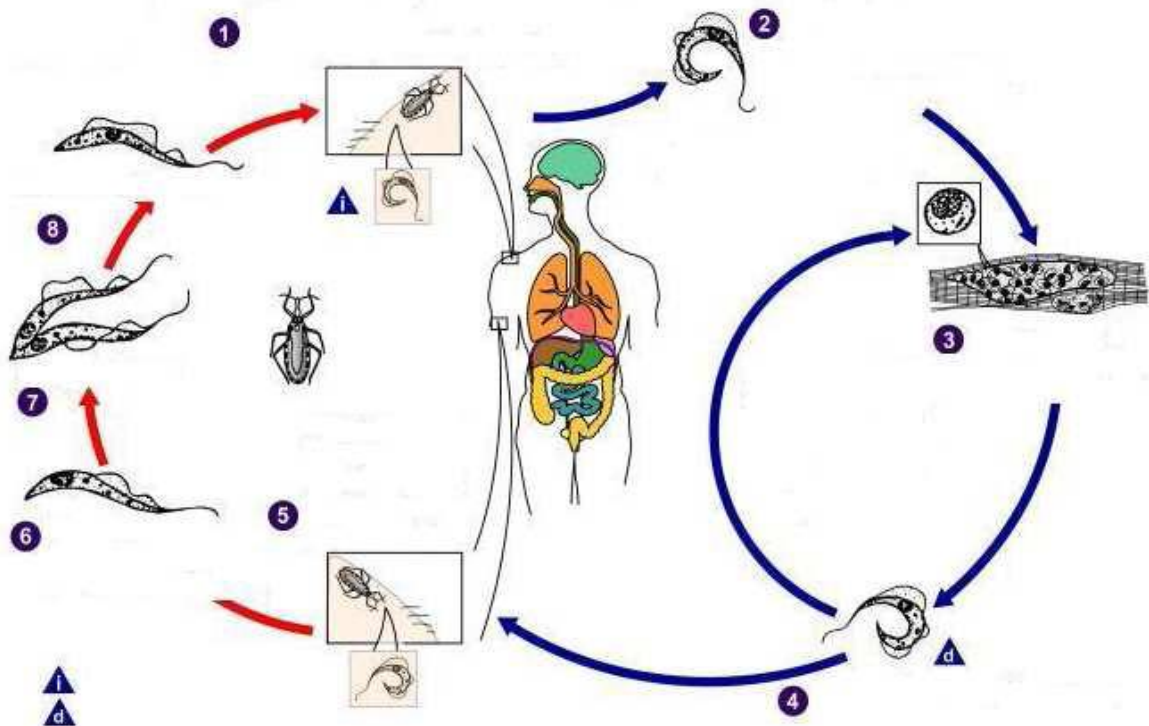
O estado de Pernambuco não reflete o padrão epidemiológico da doença de Chagas seguido pelo Brasil, nem pela região Nordeste. Em relação ao número de óbitos, o estado tem demonstrado uma tendência estacionária (BRAZ *et al.*, 2011). Dados recentes, encontrados através de um inquérito no Hemocentro do Estado de Pernambuco mostraram que no período de 2002 a 2007, 1.264 indivíduos candidatos a serem doadores de sangue apresentaram sorologia reagente para infecção pelo *T. cruzi*, o que representou 6,89% do descarte de bolsas e uma prevalência de 0,17% (MELO *et al.*, 2009).

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

2.2 Mecanismos de Transmissão da doença de Chagas

A forma clássica de transmissão da doença de Chagas, como descrita por Carlos Chagas, é a vetorial, através de insetos hematófagos, da família Reduviidae, pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, que são popularmente conhecidos como barbeiros (LANA; TAFURI, 2005). Embora mais de 130 espécies de triatomíneos tenham sido identificadas, apenas algumas são vetores competentes para o *T. cruzi*. *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as três espécies mais importantes na transmissão do *T. cruzi* para o homem (BRASIL, 2005). A transmissão vetorial acontece pelo contato do homem susceptível com as excretas contaminadas do vetor (Figura 2). Esses, ao fazerem repasto sanguíneo, em geral defecam após o ato, eliminando as formas infectantes de tripomastigotas metacíclicos que penetram na circulação do hospedeiro através do orifício da picada ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar (BARBOSA, 2009).

Figura 2 - Ciclo de vida do protozoário *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro humano e no inseto vetor.



Fonte: Barbosa (2009).

Nota: (1) O inseto pica e defeca ao mesmo tempo. O tripomastigota metacíclico passa à ferida nas fezes. (2) Os tripomastigotas invadem células onde se transformam em amastigotas. (3) Os amastigotas multiplicam-se dentro das células. (4) Os amastigotas transformam-se em tripomastigotas sanguíneos, as células são rompidas e os parasitas são liberados na corrente sanguínea podendo invadir novas células onde se multiplicam em amastigotas. (5) Os tripomastigotas sanguíneos podem ser sugados por um novo inseto, reiniciando o ciclo do parasita. (6) No tubo digestivo do inseto os tripomastigotas sanguíneos se transformam em epimastigotas, que se multiplicam (7) e que se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (8). i = estágio infeccioso; d = estágio diagnóstico.

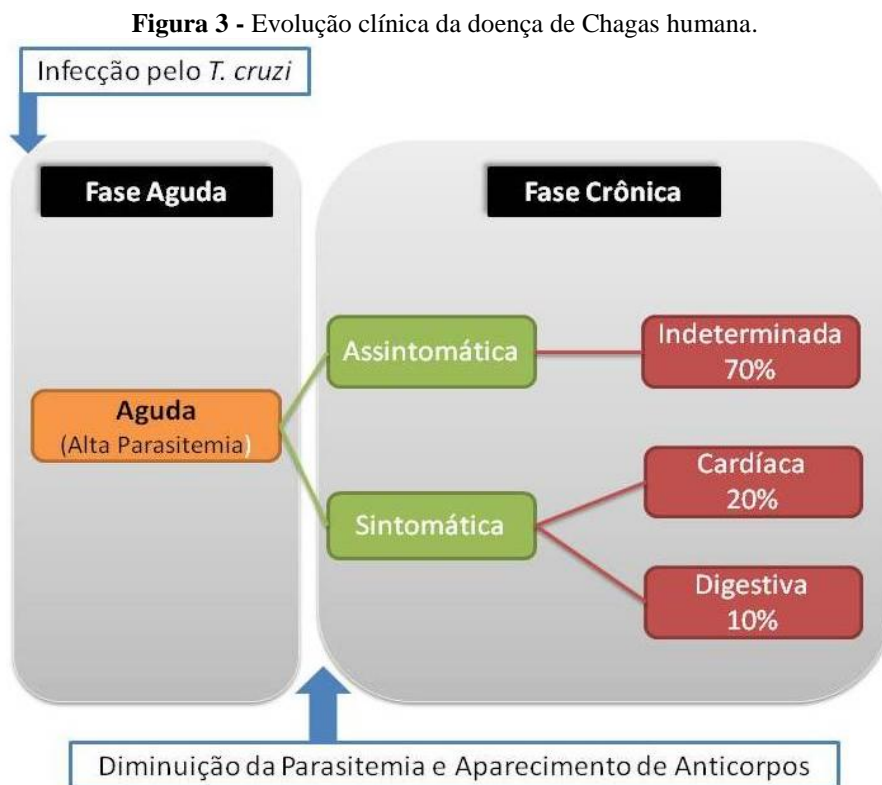
A infecção também pode ser transmitida pelo do sangue e/ou por órgãos sólidos contaminados. A maioria dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* apresenta, durante toda a vida, antígenos parasitários nos tecidos e/ou sangue, o que significa que devem ser excluídos das doações de sangue e órgãos, para evitar essa forma de transmissão da doença. Além disso, mulheres portadoras da doença de Chagas podem passar a doença para seus filhos, visto que antígenos do *T. cruzi* ou o próprio parasita podem atravessar a placenta (BRASIL, 2005).

As medidas para o controle da doença modificaram sua epidemiologia, no que diz respeito à sua prevalência e incidência e às suas formas de transmissão. A transmissão da doença de Chagas por via transfusional constitui é o mecanismo de maior importância na transmissão mundial do *T. cruzi*. Nos países não endêmicos, a transmissão ocorre por transfusão sanguínea, visto que os mesmos não realizam a triagem pela infecção pelo *T. cruzi* em seus candidatos à doação de sangue. A transmissão congênita é considerada o segundo mecanismo de grande importância na transmissão da doença de Chagas (SCHMUNIS, 2007).

Existem ainda outras vias de transmissões, como a acidental, pela manipulação de material de laboratório contaminado e a oral, através da ingestão de alimentos contendo fezes contaminadas de barbeiro (DIAS, 1999; PUNUKOLLU *et al.*, 2007). No Brasil, vários relatos recentes de surtos de contaminação oral pela ingestão de açaí *in natura* e/ou caldo de cana-de-açúcar tem sido notificados às autoridades sanitárias do país, que alertam para uma vigilância e controle maior na manipulação e comercialização destes produtos (STEINDEL *et al.*, 2008).

2.3 Manifestações Clínicas da doença de Chagas

De acordo com suas manifestações clínicas, a doença de Chagas é dividida em duas fases: aguda e crônica (Figura 3). A fase aguda, geralmente assintomática, dura de 1 a 3 meses após a infecção e é caracterizada laboratorialmente por uma alta parasitemia (GOMES, 1996). Quando sintomática, as manifestações surgem de 7 a 10 dias após a infecção. Os indivíduos apresentam febre, edema e cefaléia. Algumas manifestações sistêmicas como hepatomegalia, esplenomegalia e alterações nervosas também podem estar presentes na fase aguda da doença. No entanto, a fase aguda é imperceptível em grande parte dos indivíduos, devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas (LANA; TAFURI, 2005). Os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* após passarem pela fase aguda da doença podem apresentar, após um período variável de tempo, uma das formas clínicas crônicas. Estas formas são marcadas pela escassez de parasitas no sangue e pelos elevados títulos de anticorpos (GOMES, 1996).



Fonte: Adaptado de Dutra *et al.* (2009).

O indivíduo com doença de Chagas que permanece por um longo período de latência clínica tem a forma chamada indeterminada, que pode durar de dez a trinta anos ou por toda a vida do doente. Na forma indeterminada da fase crônica, os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* são assintomáticos, com eletrocardiograma e estudo radiológico do coração, esôfago e cólons normais, mas a sorologia é positiva. Esta forma tem particular interesse médico-social e trabalhista pelo fato de indivíduos chagásicos, assintomáticos e, em plena faixa produtiva da vida, serem excluídos do mercado de trabalho (OLIVEIRA Jr., 1991).

Os portadores da doença de Chagas que apresentam a forma indeterminada geralmente evoluem para a forma cardíaca numa frequência de 2% a cada ano, gerando entre 20 e 30% de portadores da doença de Chagas com algum tipo de alteração cardíaca (PRATA, 2001). A forma crônica cardíaca da doença é responsável por um maior número de óbitos e é caracterizada por uma síndrome de insuficiência cardíaca congestiva, predominantemente arritmica e tromboembólica, onde a morte súbita pode ser a primeira manifestação. O bloqueio de ramo direito é a alteração mais frequente do ponto de vista eletrocardiográfico. Patologicamente, o aneurisma apical do ventrículo esquerdo é uma lesão característica da doença (ANDRADE, 1996).

A forma digestiva da doença é caracterizada pela dilatação de vísceras ocas, sendo o megaesôfago e o megacólon as mais relatadas. O megaesôfago se manifesta comumente com disfagia e o megacólon com constipação (REZENDE; MOREIRA, 2000). As manifestações digestivas apresentam uma frequência de 10 a 20% entre os portadores da doença de Chagas, com uma taxa de incidência de 1,1% ao ano (CASTRO *et al.*, 1994). Indivíduos infectados pelo *T. cruzi* com a forma mista são portadores de cardiopatia de origem por doença de Chagas e megaesôfago e/ou megacólon simultaneamente (LANA; TAFURI, 2005).

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

2.4 Diagnóstico Laboratorial da doença de Chagas

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

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

Na fase crônica da doença, o diagnóstico deve ser realizado através de métodos imunológicos. Esses métodos se baseiam na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* do isotipo Imunoglobulina G (IgG) que se ligam a antígenos do parasita (GOMES, 1996). Podem ser utilizadas as técnicas de hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, ou ensaio imunoenzimático. Segundo o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (BRASIL, 2005), para um diagnóstico sorológico confiável, é necessário obter resultados concordantes em pelo menos 2 testes sorológicos de princípios metodológicos ou preparações antigênicas diferentes.

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

2.5 Tratamento da doença de Chagas

2.5.1 Tratamento Etiológico

Até o presente momento, não existe um medicamento comprovadamente eficaz para o tratamento etiológico da doença de Chagas. Os antiparasitários tradicionalmente utilizados, Nifurtimox e Benzonidazol, são parcialmente eficazes, tendo sua maior eficácia terapêutica apenas na fase aguda da infecção (MARIN-NETO *et al.*, 2009). Ambas as drogas atuam nas formas tripomastigotas no sangue, porém, são pouco efetivas contra amastigotas no tecido. Por essa razão é que sua eficácia na fase crônica é comprometida (CANÇADO, 1985).

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

Há mais de 25 anos não são produzidos novos fármacos com maior eficácia e menos efeitos colaterais do que as duas únicas drogas ainda utilizadas no tratamento etiológico da doença de Chagas (SANTOS *et al.*, 2004). Um grande volume de trabalhos científicos trata da biologia e genética do *T. cruzi*, porém esse conhecimento gerado não foi revertido em novas ferramentas terapêuticas. A falta de novos medicamentos para esta doença é o resultado tanto de insuficientes políticas públicas voltadas para produção e desenvolvimento de fármacos, quanto da falha de mercado, provocada pelo baixo interesse econômico que essa doença representa para a indústria (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES *initiative*, 2011).

2.5.2 Tratamento Sintomático

O manejo da cardiopatia chagásica crônica exige um conhecimento específico das respostas que as drogas utilizadas na prática cardiológica apresentam nesses indivíduos. É válido ressaltar que o tratamento de início precoce e bem conduzido beneficia significativamente o prognóstico de muitos indivíduos, podendo aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade, permitindo o desenvolvimento de atividades habituais desde que não impliquem em grandes esforços físicos (OLIVEIRA Jr., 2009).

As drogas administradas aos cardiopatas chagásicos crônicos são as mesmas que se usam em outras cardiopatias de origem não chagásica (hipertensivas, congênitas, isquêmicas e idiopáticas): cardiotônicos, diuréticos, antiarrítmicos e vasodilatadores. Em casos de bradicardia, indica-se a implantação de marca-passo, que tem apresentado resultados bastante satisfatórios (OLIVEIRA Jr., 2009).

O tratamento das manifestações digestivas da doença de Chagas depende do estágio em que a doença é diagnosticada. Indicam-se medidas pouco invasivas (dietas, laxativos e/ou lavagens) em estágios precoces, enquanto que em estágios mais avançados, impõe-se a dilatação ou correção cirúrgica do órgão afetado (CASTRO *et al.*, 1994).

2.6 Imunopatogênese da doença de Chagas

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

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

As manifestações patológicas da doença de Chagas crônica, tanto na forma cardíaca, como na forma digestiva, estão associadas com a ocorrência de uma reação pró-inflamatória nos órgãos afetados, especialmente em locais onde antígenos de *T. cruzi* foram observados (FUENMAYOR *et al.*, 2005). A forma indeterminada representa uma situação de "equilíbrio saudável" entre o parasita e o hospedeiro, sendo a resposta imune induzida por estes indivíduos de caráter predominantemente antiinflamatório (DUTRA *et al.*, 2009).

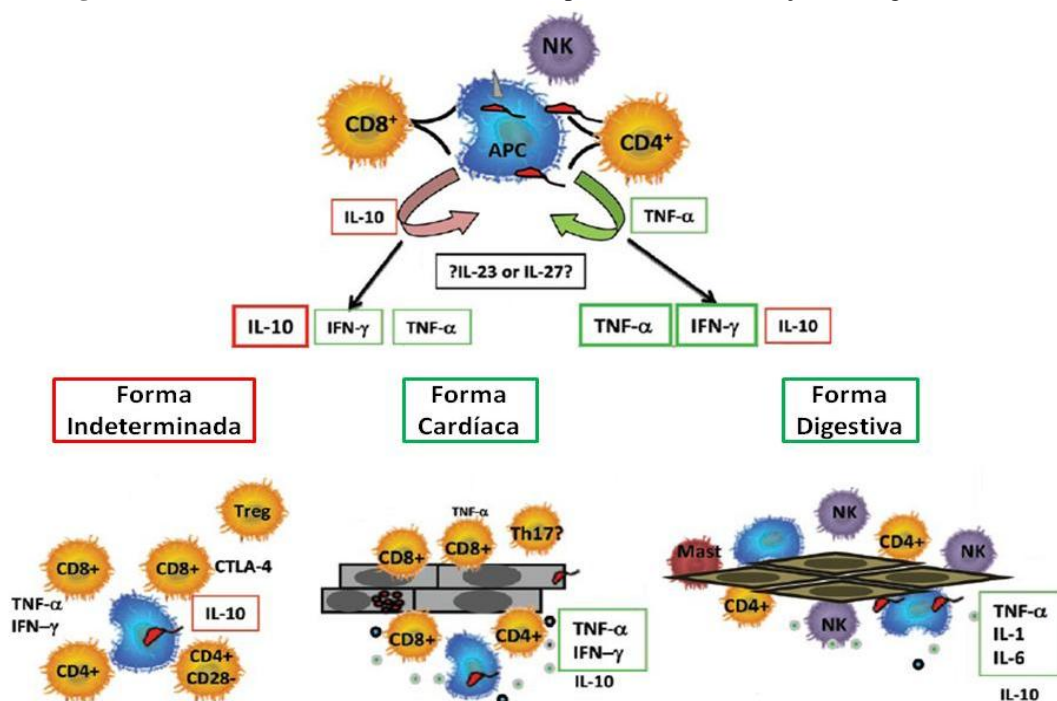
A intensidade da resposta inflamatória que se estabelece nos órgãos afetados, leva ao controle da parasitemia, porém acaba por causar lesão tecidual. Segundo alguns autores, células endoteliais do tecido cardíaco e da mucosa esofágica e intestinal de portadores da doença de Chagas apresentam um aumento da expressão de moléculas de antígeno leucocitário humano (REIS *et al.*, 1993). Essas moléculas estão envolvidas na apresentação de antígenos para os linfócitos T. O aumento da expressão dessas moléculas é sugestivo da presença de citocinas no local do estímulo. Estudos realizados com tecido cardíaco e da mucosa gastrointestinal de portadores da doença de Chagas identificaram a presença de citocinas inflamatórias como o Interferon-*gama* (INF- γ), o Fator de Necrose Tumoral-*alfa* (*Tumor Necrosis Factor-alpha* - TNF- α) e a Interleucina-6 (IL-6) nos tecidos dos indivíduos sintomáticos (REIS *et al.*, 1993; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Em concordância com o que se observa no tecido lesado, trabalhos realizados com amostras de sangue periférico de portadores da doença de Chagas demonstram que a infecção crônica sintomática induz uma resposta imunológica de perfil inflamatório, com proliferação de linfócitos T auxiliares (T *helper* – Th) do tipo 1 (Th1) e produção sistêmica de suas citocinas. Já a infecção assintomática é caracterizada pela supressão desse perfil, com exacerbação de linfócitos Th do tipo 2 (Th2) e suas citocinas antiinflamatórias (ABEL *et al.*, 2001; CUNHA-NETO *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 2003).

Recentemente, alguns autores também têm reconhecido a importância de linfócitos T regulatórios na patogênese da doença de Chagas crônica (ARAÚJO *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2009). Estas células foram previamente descritas como uma população de linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ que pode suprimir a resposta imune através da produção das citocinas anti-inflamatórias, Interleucina-10 (IL-10) e Fator de Transformação do Crescimento-beta (*Transforming growth factor-beta* - TGF- β) (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005). Em um estudo de revisão sistemática, Araújo *et al.* (2007) concluíram que estas células estão em níveis mais elevados em portadores da doença de Chagas assintomáticos, quando comparados com os níveis dos sintomáticos.

Apesar de alguns trabalhos terem demonstrado o envolvimento da imunidade celular em todas as formas clínicas da infecção chagásica, os mecanismos que favorecem a predisposição a uma determinada forma clínica crônica ainda não estão completamente esclarecidos (DUTRA *et al.*, 2005). Padrões específicos de secreção de algumas citocinas por alguns tipos celulares foram previamente estabelecidos por diversos grupos de pesquisa entre os portadores das diferentes formas clínicas da doença de Chagas, com o intuito de melhorar o entendimento da sua imunopatogênese (Figura 4).

Figura 4 - Citocinas e células envolvidas na resposta imune da doença de Chagas crônica.



Fonte: Adaptado de Dutra *et al.* (2009).

O conhecimento das diferenças existentes entre os perfis imunológicos dos indivíduos sintomáticos e assintomáticos pode gerar subsídios para a elaboração de novos métodos de prevenção e terapêuticos, conduzindo a possíveis medidas que possam modificar a história natural da doença em benefício dos milhões de chagásicos existentes (DUTRA *et al.*, 2009).

2.7 Marcadores Imunológicos de Evolução da doença de Chagas

Com o objetivo de diferenciar os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* com potencial de evolução para as formas clínicas crônicas graves, alguns grupos de pesquisa tentam, portanto, estabelecer marcadores biológicos de evolução da doença de Chagas, através de mecanismos imunológicos (CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 1999; CUNHA-NETO *et al.*, 1998).

Há cerca de dez anos, o grupo de pesquisa em doença de Chagas do CPqAM/Fiocruz trabalha em colaboração com o Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE. A avaliação de marcadores biológicos que permitam a diferenciação entre as formas clínicas crônicas da doença vem sendo desenvolvida pelo grupo com a utilização dos antígenos recombinantes CRA (*Cytoplasmatic Repetitive Antigen*) e FRA (*Flagelar Repetitive Antigen*) do *T. cruzi*.

Em relação à resposta imune humoral, a avaliação dos níveis séricos de anticorpos contra os antígenos CRA e FRA do *T. cruzi* em portadores da doença de Chagas crônica demonstrou alguns resultados promissores. Verçosa *et al.* (2007) estudaram o perfil isotípico de IgG e observaram que o isotipo IgG2 anti-FRA está presente em níveis elevados no soro de portadores da forma cardíaca, sugerindo que este isotipo pode atuar como um marcador de evolução para o dano cardíaco. Vasconcelos *et al.* (2010) avaliaram os níveis de IgA e concluíram que a presença deste anticorpo contra os antígenos utilizados é um candidato a marcador do dano digestivo, visto que os portadores dessa manifestação apresentaram níveis mais elevados de IgA do que os demais. Já em relação aos níveis de IgM contra os antígenos utilizados, não foram observadas diferenças estatisticamente significante entre os portadores de diferentes formas clínicas da infecção chagásica crônica (VASCONCELOS *et al.*, 2011).

No que concerne à resposta imune celular, várias abordagens já foram propostas, também com a utilização dos antígenos CRA e FRA do *T. cruzi*. Lorena *et al.* (2008) avaliaram a produção das citocinas TNF- α , IL-4, IL-10 e IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico após estímulo *in vitro* com os referidos antígenos. Os resultados mostraram que o antígeno CRA foi capaz de induzir uma resposta imune do tipo Th1, com elevada secreção de TNF- α e IFN- γ em portadores da doença de Chagas crônica. No entanto, não foi encontrada nenhuma diferença significativa nos níveis destas citocinas entre os portadores da doença de Chagas crônica (LORENA *et al.*, 2008). Em um estudo posterior, analisando a produção de citocinas intracitoplasmáticas por linfócitos T e monócitos após estímulo *in vitro* com os antígenos CRA e FRA do *T. cruzi* através de citometria de fluxo, Lorena *et al.* (2010) encontraram algumas diferenças na produção das citocinas IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ entre os portadores das formas indeterminada e cardíaca e entre os portadores de cardiopatia com diferentes níveis de dano cardíaco. Os autores demonstraram uma associação entre a alta produção de TNF- α e IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ e a gravidade da cardiopatia chagásica, quando utilizado o antígeno CRA e sugerem que estas citocinas podem ser utilizadas como marcadores imunológicos para acompanhamento da forma cardíaca da doença de Chagas crônica (LORENA *et al.*, 2010).

A presença de linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ produtores de IL-10 também foi avaliada em portadores da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com os antígenos CRA e FRA do *T. cruzi* através de citometria de fluxo, por Braz *et al.* (2013). Os autores demonstraram que indivíduos assintomáticos apresentaram níveis mais elevados destas células que os demais. Recentemente, Melo *et al.* (2012) avaliaram a expressão gênica das citocinas IL-10 e IFN- γ em células mononucleares de sangue periférico de portadores da doença de Chagas após estímulo *in vitro* com os referidos antígenos. Apesar de não terem encontrado diferenças estatisticamente significantes, os autores demonstraram pequenas diferenças na expressão destas citocinas entre os portadores das formas indeterminada e cardíaca e entre portadores de cardiopatia chagásica com diferentes graus de dano cardíaco.

Os diversos achados relacionados com a produção e expressão diferencial das citocinas IL-10 e TNF- α nos portadores da doença de Chagas crônica com diferentes formas clínicas tornaram estas moléculas alvos de estudos de polimorfismos genéticos pelo referido grupo de pesquisa. A avaliação de SNPs, que possam ser associados com as diferentes formas clínicas e com a gravidade das mesmas será de extrema importância para elucidar os fatores imunogenéticos que estariam influenciando no espectro de expressão clínica da doença de Chagas. Além disso, o monitoramento precoce de indivíduos assintomáticos com potencial de evolução para as formas sintomáticas, baseado em seu perfil genético, através da genotipagem de seus alelos possivelmente polimórficos, pode ser aplicado na rotina ambulatorial.

2.8 Polimorfismos de Único Nucleotídeo (SNPs)

Dois genomas humanos sorteados ao acaso apresentam identidade de 99,9% em suas seqüências de DNA. As variações nas seqüências gênicas entre dois indivíduos são, portanto, encontradas apenas em 0,1% do DNA. Essas variações são comumente atribuídas a alterações de um único par de bases de um nucleotídeo, um SNP, em um *locus* gênico específico. Comumente associados à diversidade populacional, os SNPs, que estão abundantemente distribuídos por todo o genoma, podem conferir susceptibilidade diferencial a doenças e resposta individual a medicamentos (SHASTRY, 2002). Existem mais de 10 mil SNPs descritos e depositados em bancos de dados públicos. É válido ressaltar que existem diferenças acentuadas entre as populações humanas em termos de distribuição dos SNPs, podendo fazer com que alelos raros em uma determinada população sejam extremamente abundantes em outras (KUBISTOVA *et al.*, 2009).

Alguns SNPs afetam a sequência de aminoácidos de uma determinada proteína, por estarem localizados dentro de regiões gênicas que serão codificadas e expressas (éxons). Esse tipo de SNP, denominado estrutural, é, geralmente, responsável por mudanças na estrutura protéica com perda ou redução da função original ou da capacidade de ligação da mesma (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

SNPs encontrados em regiões gênicas não-codificantes (íntrons) ou em regiões reguladoras/promotoras de um gene não acarretam em mudanças na sequência de aminoácidos da proteína, no entanto, podem alterar a capacidade de transcrição gênica e, conseqüentemente sua produção local ou sistêmica. Este tipo de polimorfismo é denominado funcional por conferir diferenças interindividuais na síntese e secreção de proteínas e são os mais utilizados em estudos de associação de doenças, por evidenciarem geneticamente a produção diferencial de certas moléculas entre os indivíduos afetados (OLLIER, 2004).

2.8.1 Genotipagem de SNPs

Uma grande variedade de tecnologias e protocolos para genotipagem de SNPs é disponibilizada atualmente. Inicialmente, na década de 80, os SNPs, eram somente detectados pelo uso de enzimas de restrição após amplificação das regiões de interesse por PCR (SOBRINO *et al.*, 2005). A tecnologia da PCR, desenvolvida por Kary Mullis nos anos 80, é um marco tecnológico no estudo do DNA. A síntese enzimática *in vitro* de seqüências específicas de DNA através do uso de dois iniciadores ou *primers* (oligonucleotídeos) que hibridizam fitas opostas de DNA permitiu o enorme avanço da área. A PCR é composta de três etapas básicas: desnaturação, anelamento e extensão, o que torna possível a amplificação de seqüências específicas de DNA de tamanhos que variam de 50 a 2000 pares de bases sem a necessidade do uso de células vivas (NOVAIS *et al.*, 2005).

Com o aparecimento da PCR em tempo real, em 1992, por Higuchi e colaboradores, a amplificação de fragmentos de DNA se tornou precisa e reproduzível, pois esta técnica realiza o monitoramento da amplificação e determina seu sucesso em tempo real (KUBISTA *et al.*, 2006). A técnica de PCR em tempo real baseia-se na detecção de moléculas fluorescentes que aumentam a emissão de fluorescência quando o produto de amplificação acumula-se em cada ciclo da reação, de forma que tal emissão é gravada durante cada ciclo e representa a quantidade do produto amplificado (DUSSAULT *et al.*, 2006). A plataforma da reação requer um sistema óptico para excitação da fluorescência e outro para a captação da emissão, onde as informações adquiridas são transmitidas para um *software*.

Existem dois tipos principais de substâncias fluorescentes utilizadas na PCR em tempo real: SYBR Green e TaqMan. O SYBR Green se intercala na dupla fita de DNA e após a excitação pela luz emite fluorescência proporcional a quantidade de DNA amplificado (DUSSAULT *et al.*, 2006). As sondas TaqMan, dirigidas especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar, possuem um marcador fluorescente *reporter* na extremidade 5', capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Entretanto, na sua posição nativa, a luz emitida por esse fluorocromo é absorvida por outro marcador, o *quencher*, presente na extremidade 3' (NOVAIS *et al.*, 2005). Dessa forma, o sistema óptico do equipamento não detecta fluorescência no tubo de reação, porém, durante a amplificação, a sonda que se hibridizou ao produto-alvo é clivada pela atividade exonucleásica da enzima Taq DNA polimerase. Como consequência, essa sonda é degradada e o fluorocromo fica distante do *quencher* que agora não é mais capaz de absorver a luz emitida. Assim, ocorre um aumento na intensidade de fluorescência, proporcional a quantidade de produtos amplificados, o que permite a quantificação da sequência de DNA alvo (JOHNSON *et al.*, 2004).

A curva de quantificação de DNA através da PCR em tempo real é gerada durante a amplificação do material genético, e consiste de três fases: uma fase *lag*, no qual os produtos ainda não podem ser mensurados; uma fase exponencial, onde a detecção da fluorescência é alcançada; e uma fase platô (DUSSAULT *et al.*, 2006). O ponto na curva, dentro da fase exponencial, no qual a quantidade de fluorescência ultrapassa o sinal basal é chamado de ciclo *threshold* (Ct). Este ponto é de crucial importância, pois determina o sucesso da amplificação, permite quantificar a concentração de DNA e pode ser utilizado para a genotipagem de diferentes alelos (GRAY *et al.*, 2000; WILHELM *et al.*, 2003).

2.9 SNPs em Genes de Citocinas

Apesar das citocinas apresentarem um baixo grau de variação genética, um número cada vez maior de estudos vem implicando os SNPs localizados em regiões reguladoras de genes de citocinas como fatores que podem influenciar na susceptibilidade ou na evolução de uma doença infecciosa, pois geralmente acarretam em diferenças na síntese e secreção destas. Nos últimos anos, vários SNPs têm sido associados à susceptibilidade e a variabilidade de manifestações clínicas em doenças infecciosas e parasitárias que tem uma patogênese inflamatória como tuberculose, hanseníase, hepatite, esquistossomose, dengue, malária, além da doença de Chagas (OLLIER, 2004).

As diferenças existentes nos níveis de produção e expressão de IL-10 e TNF- α entre os portadores da doença de Chagas crônica é o motivo principal para a escolha dessas citocinas como alvo de estudos de SNPs na doença de Chagas crônica (BRAZ *et al.*, 2013; LORENA *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2012).

2.9.1 SNPs no gene *IL-10*

A IL-10 é uma citocina muito importante na regulação da resposta imune, devido a sua capacidade de “desligar” a produção de citocinas inflamatórias por linfócitos T, por isso ela foi originalmente denominada Fator Inibidor da Síntese de Citocinas (FIORETINO *et al.*, 1989). A IL-10 é produzida por várias células e sua produção é regulada por outras citocinas como a IL-4, a IL-13 e o IFN- γ , que inibem a sua produção (CHOMARAT *et al.*, 1993).

O gene *IL-10* está localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q31.32) e sua região promotora é altamente polimórfica, sendo os SNPs localizados nas posições -1082(G/A), -819(C/T) e -592(A/C) os mais estudados. Os genótipos GG, GA e AA da posição -1082 correspondem respectivamente a fenótipos alto, intermediário e baixo produtor desta citocina, independente das variações nucleotídicas encontradas nas posições -819 e -592 do promotor do gene da IL-10 (TURNER *et al.*, 1997).

2.9.2 SNPs no gene *TNF- α*

O TNF- α , originalmente identificado como agente antitumoral, é uma citocina pró-inflamatória, produzida por várias células do sistema imune em resposta a uma variedade de estímulos e que exerce múltiplos efeitos biológicos. A expressão do TNF- α é rigidamente controlada, porque uma superprodução sistêmica desta citocina ativa respostas inflamatórias à infecção e lesão, com dano tecidual generalizado (WANG *et al.*, 2003).

O gene *TNF- α* está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31), dentro do complexo principal de histocompatibilidade de classe III, e contém vários SNPs, dos quais dois são os mais estudados. O primeiro está localizado na posição -238 e o segundo na posição -308, ambos em relação ao sítio de início da transcrição, onde a presença de guanina define o alelo de tipo selvagem, isto é, o alelo mais comum. Tem sido demonstrado para ambas as posições que a presença de adenina resulta em uma transcrição duas vezes maior, com implicações funcionais nos níveis de secreção da citocina (WILSON *et al.*, 1997).

3 JUSTIFICATIVA

Diante da importância e magnitude da doença de Chagas, com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas mundialmente, e das elevadas taxas de morbidade e mortalidade, sobretudo na cardiopatia chagásica, justificam-se estudos que visem aprofundar o entendimento dos fatores que estão envolvidos na susceptibilidade à doença, na transição da fase aguda para a crônica, na progressão para as formas sintomáticas e na evolução das mesmas. Considerando que os fatores genéticos e imunes do hospedeiro humano têm sido associados às diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas crônica, o estabelecimento de marcadores imunogenéticos de evolução/progressão pode permitir o desenvolvimento de novos métodos prognósticos, além de novas medidas terapêuticas. A associação de SNPs com o espectro de expressão clínica da doença de Chagas crônica será de extrema importância, pois o monitoramento precoce de indivíduos com potencial de evolução para as formas mais graves, através da genotipagem de seus alelos, pode ser aplicado na rotina ambulatorial. Diante do exposto e baseando-se no potencial de aplicabilidade dessa abordagem na prática clínica, este estudo se propôs a avaliar se a presença de SNPs nos genes das citocinas IL-10 e TNF- α estaria associada com a expressão clínica da infecção chagásica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar SNPs nos genes das citocinas IL-10 e TNF- α em portadores da doença de Chagas crônica com as formas indeterminada e cardíaca.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar os dados epidemiológicos e clínicos de portadores da doença de Chagas crônica selecionados no estado de Pernambuco;
 - b) Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* nos portadores da doença de Chagas crônica selecionados;
 - c) Comparar as frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* encontradas nos portadores da doença de Chagas crônica com os resultados de outros estudos realizados no estado de Pernambuco;
 - d) Associar as frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* com as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas crônica e com a gravidade da cardiopatia chagásica.
-
-

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 Etapas e Desenho do Estudo

O presente estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira, foi realizado um estudo descritivo, de corte transversal, para caracterizar dados epidemiológicos e clínicos de uma população de portadores da doença de Chagas crônica e determinar as frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* . A escolha dos alvos foi baseada nas associações existentes entre sua expressão e produção e as formas clínicas da doença de Chagas crônica (BRAZ *et al.*, 2013; LORENA *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2012). Além disso, as frequências genotípicas e alélicas obtidas nos portadores da doença de Chagas crônica foram comparadas com as obtidas em outros estudos científicos que avaliaram os mesmos SNPs em populações portadoras de outras doenças no estado de Pernambuco.

Na segunda etapa, realizou-se um estudo de associação, retrospectivo, do tipo caso-controle, onde foram definidos como casos os portadores da doença de Chagas com a forma clínica cardíaca. Indivíduos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* assintomáticos, ou seja, portadores da forma indeterminada formaram o grupo controle. Segundo Drigo *et al.* (2007), os indivíduos assintomáticos, também infectados pelo *T. cruzi*, assim como os sintomáticos, porém sem as manifestações clínicas da doença são considerados o grupo controle ideal.

5.2 Local do Estudo

O estudo foi realizado no Departamento de Imunologia do CPqAM/Fiocruz e no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE, ambos situados na Região Metropolitana do Recife, Pernambuco.

No Departamento de Imunologia do CPqAM/Fiocruz são desenvolvidos estudos sobre doenças infecciosas e parasitárias utilizando abordagens imunológicas, epidemiológicas e de biologia molecular. Em geral, os projetos têm caráter aplicativo, visando ao entendimento do relacionamento patógeno-hospedeiro, diagnóstico, imunoterapia e controle.

O Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE, que atende indivíduos provenientes de todo o estado de Pernambuco, é um centro de referência no atendimento do portador da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. A filosofia de trabalho no ambulatório é dar atenção integral ao portador da doença, não só com ações de tratamento, mais também com o enfoque biopsicossocial (OLIVEIRA Jr., 2009).

5.3 População de Estudo

Foram incluídos neste estudo indivíduos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, de ambos os sexos e maiores de 18 anos, que foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE de janeiro de 2011 a dezembro de 2012.

Na rotina do ambulatório, os indivíduos são submetidos a exames clínico-laboratoriais para o acompanhamento das manifestações clínicas decorrentes da infecção chagásica, que incluem exame físico, ecocardiograma, eletrocardiograma, raios X de tórax e radiografia contrastada de esôfago, além de sorologia para *T. cruzi*. A interpretação dos exames de rotina dos indivíduos e a consequente classificação nas formas clínicas crônicas da doença de Chagas foram realizadas pela equipe médica do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE.

5.4 Definição dos Grupos de Estudo

Os critérios adotados para categorizar um indivíduo em determinada forma clínica, foram os mesmos descritos no Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (BRASIL, 2005).

Indivíduos que apresentaram sorologia positiva para a infecção pelo *T. cruzi*, sem manifestações clínicas de acometimento do coração ou trato digestivo, foram considerados como portadores da forma indeterminada (IND).

A presença de sorologia positiva para infecção chagásica, juntamente com sintomas de insuficiência cardíaca ou síncope, alterações eletrocardiográficas, marcapasso implantado, diminuição da função ventricular, aneurisma apical no ecocardiograma ou radiografia do tórax com aumento da área cardíaca foram os critérios utilizados para categorizar um indivíduo como portador da forma cardíaca (CARD). Além disso, para avaliação da gravidade da cardiopatia chagásica, os portadores da forma CARD foram estratificados em dois grupos de acordo com a presença de dilatação da área cardíaca (comprovada através de raios X de tórax), sendo os indivíduos divididos em cardiopatas leves (CARD 1 - sem dilatação cardíaca) e cardiopatas graves (CARD 2 - com dilatação cardíaca).

5.5 Amostra de Estudo

Considerando-se uma população alvo de 1.800 portadores da doença de Chagas, cadastrados no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE, (OLIVEIRA Jr., 2009) e uma frequência esperada do evento de interesse (cardiopatia chagásica crônica) de 30% (DUTRA *et al.*, 2009), foi realizado um cálculo amostral no *software* STATCALC do programa estatístico Epi-Info® (Atlanta, EUA). Com precisão de 95%, poder de 80%, e razão de 2 casos para cada controle, a amostra resultou em 216 portadores da doença de Chagas para o SNP -1082G/A do gene *IL-10*, de acordo com os dados publicados por Costa *al.* (2009), sendo 144 casos e 72 controles. Para o SNP -308G/A do gene *TNF- α* , baseado nos dados de Drigo *et al.* (2007), a amostra resultou em 232 portadores de doença de Chagas, sendo 156 casos e 78 controles. Porém no grupo controle, só foi possível serem selecionados 66 indivíduos para ambos os SNPs. Por outro lado, no grupo caso, conseguiu-se captar 190 indivíduos para ambos os SNPs, sendo, portanto, recrutados um total de 256 portadores da doença de Chagas.

5.6 Considerações Éticas

Os portadores da doença de Chagas envolvidos neste estudo tiveram sua participação voluntária, após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B), segundo a resolução do n.º. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que apresenta as normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. A conduta de inclusão dos indivíduos participantes deste estudo e os protocolos experimentais realizados no desenvolvimento do mesmo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz, sob o parecer de n.º 07/2010 (Anexo A).

5.7 Obtenção e Processamento das Amostras

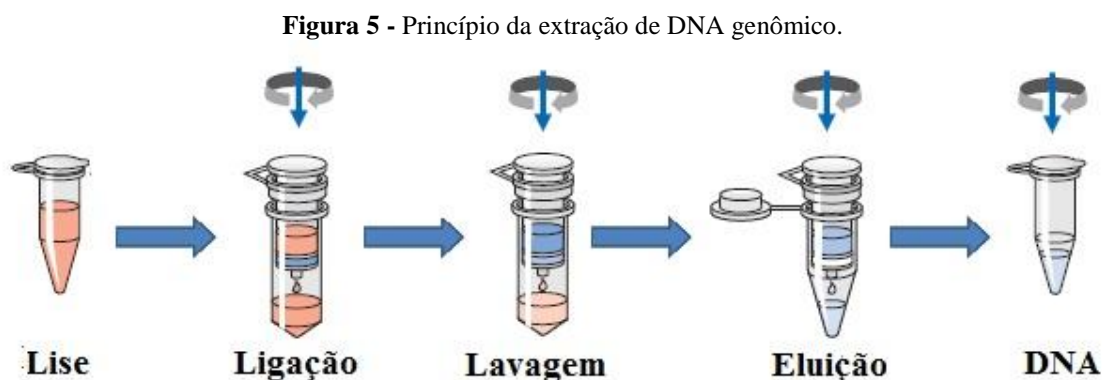
Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os indivíduos selecionados para este estudo responderam a um formulário de pesquisa (Apêndice C), para obtenção de dados epidemiológicos e clínicos (complementados com informações disponíveis no prontuário dos mesmos). Posteriormente, de cada indivíduo foi coletada, por punção venosa, uma amostra de sangue periférico, através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável, para posterior análise dos SNPs.

A coleta das amostras de sangue periférico foi realizada no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE, seguindo as normas de biossegurança. De cada indivíduo foram coletados aproximadamente 5 ml de sangue periférico em tubo com o anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético - *Ethylenediaminetetraacetic acid*). O sangue coletado foi utilizado para extração de DNA genômico no mesmo dia da coleta.

5.8 Análise Molecular

5.8.1 Extração e Purificação de DNA Genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de sangue total, através do *QIAamp DNA Blood Mini Kit* da *Qiagen*[®] (Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante (Figura 5). O *kit* contém mini-colunas que consistem de uma membrana de sílica que permite que o DNA da amostra se ligue a ela. Esta etapa foi permitida devido à ação prévia da proteinase K e do etanol, que tem a função de lisar as células e seus núcleos, deixando exposto o DNA. A remoção de contaminantes e possíveis inibidores para a PCR foi realizada através de duas etapas de lavagem tendo a função de melhorar a pureza do DNA. Após a eluição do DNA ligado a sílica, através de tampão de eluição apropriado, fornecido pelo *kit*, a amostra de DNA obtida foi acondicionada em microtubos autoclavados e estes foram armazenados a -20°C no Departamento de Imunologia do CPqAM/Fiocruz até sua posterior utilização.



Fonte: Adaptado de Qiagen (2012).

5.8.2 Avaliação da Concentração e Pureza das Amostras de DNA

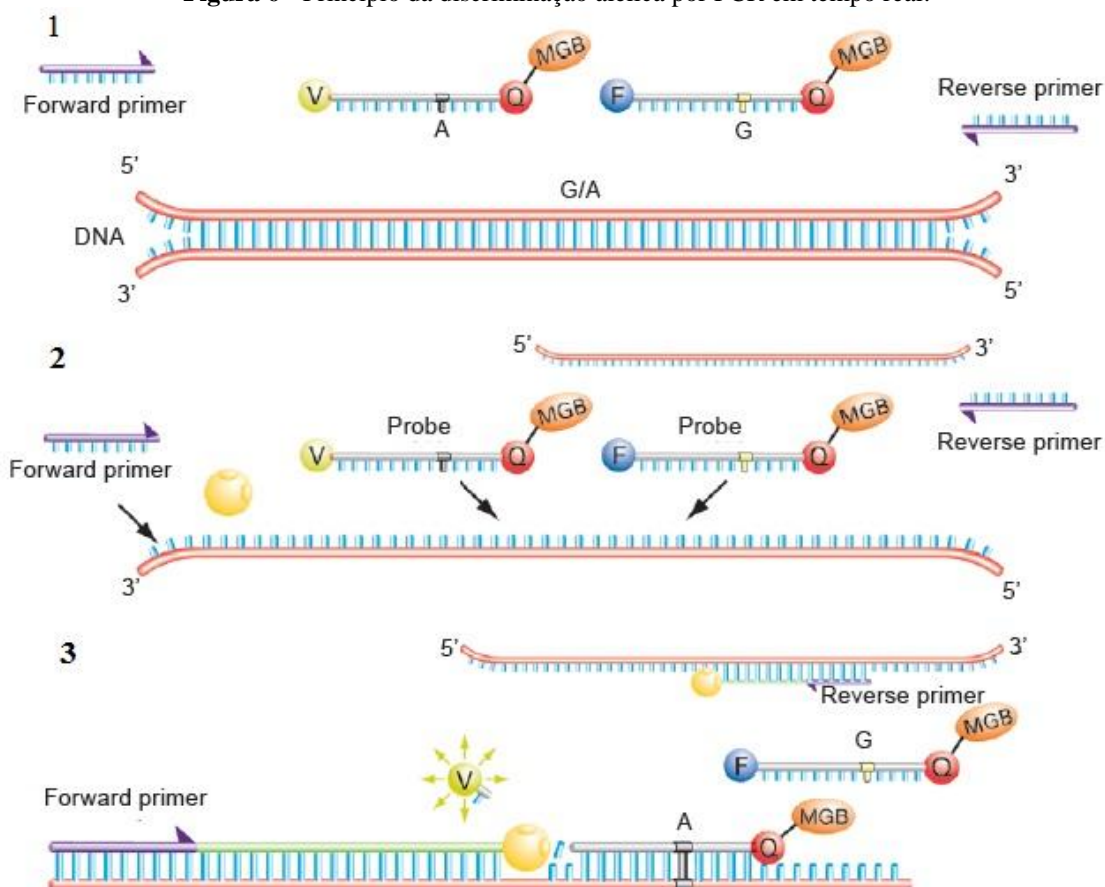
Todas as amostras de DNA obtidas foram quantificadas e avaliadas quanto ao seu grau de pureza em espectrofotômetro *Nanodrop* da *Thermo Fisher Scientific*[®] (San Jose, EUA). Após calibração do aparelho, 1 µl da amostra foi utilizado para análise. Além de determinar a concentração de DNA na amostra, o aparelho determinou a razão das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280nm que deveria estar entre 1,7 e 1,9 para garantir a integridade e pureza do DNA. Todas as amostras de DNA genômico obtidas só seguiram para genotipagem dos SNPs por terem sua razão de integridade e pureza entre esses valores.

5.8.3 Determinação dos Genótipos dos SNPs

Os genótipos dos portadores da doença de Chagas em relação aos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF-α* foram determinados por PCR em tempo real com sondas TaqMan, através de protocolos de discriminação alélica, produzidos e comercializados pela *Applied Biosystems*[®] (Foster City, EUA).

A metodologia de PCR em tempo real, com o sistema TaqMan para detecção de SNPs, consiste em amplificar a região de interesse e utilizar duas sondas marcadas com diferentes fluorocromos, desenhadas complementarmente a cada um dos alelos em estudo (Figura 6). A sonda se liga ao seu alelo específico e a fluorescência é emitida para o alelo presente na amostra. Se os dois alelos estiverem presentes, são lidos os dois tipos de fluorescência. As sondas têm em sua estrutura molecular um *quencher* que inibe o sinal emitido pelo fluorocromo ou *reporter*. Assim que ocorre o pareamento e hidrólise da sonda o composto fluorescente é liberado proporcionando liberação de energia que é captada pelo equipamento e analisada em um gráfico de amplificação. Este tipo de sonda possui uma tecnologia chamada de *Minor Groove Binder* a qual tem a capacidade de se ligar na cavidade menor do DNA aumentando a especificidade e diminuindo o *background* da reação (JOHNSON *et al.*, 2004).

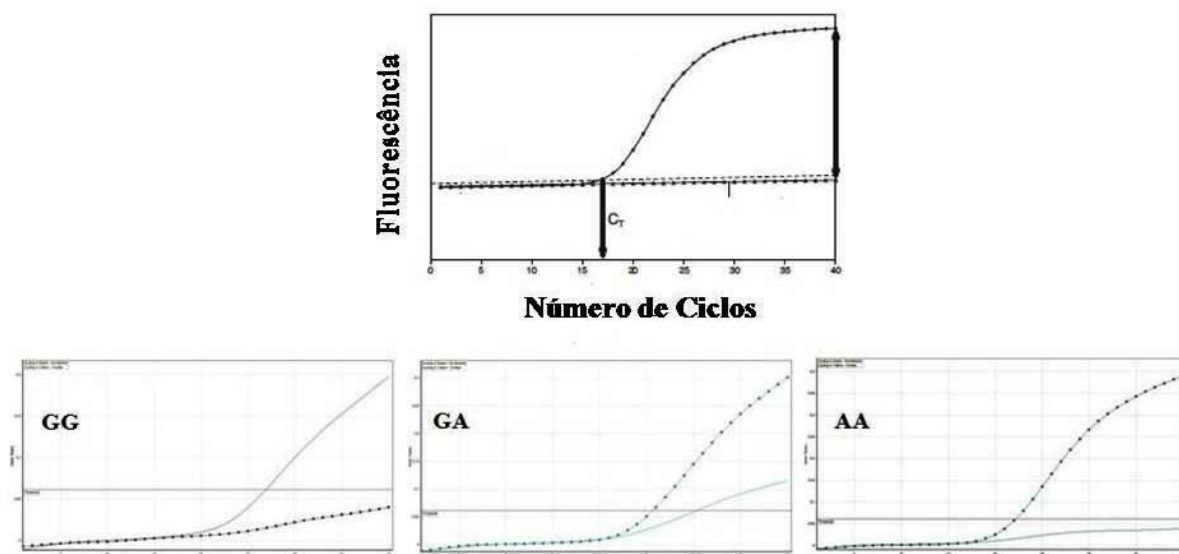
Para o SNP -1082G/A do gene *IL-10*, rs1800896 (número de acesso no *Gene Bank*, disponível no *National Center for Biotechnology Information*), foi utilizado o conjunto de *primers* e sondas disponível no TaqMan SNP *Genotyping Assay C__1747360_10* produzido pela *Applied Biosystems*[®]. Para o SNP -308G/A do gene *TNF-α*, rs1800629, foi utilizado o TaqMan SNP *Genotyping Assay C__7514879_10*. Ambos os *kits* utilizam o fluorocromo FAM para detectar o alelo G e o fluorocromo VIC para detectar o alelo A.

Figura 6 - Princípio da discriminação alélica por PCR em tempo real.

Fonte: Adaptado de Applied Biosystems (2011).

Nota: (1) Componentes do ensaio e DNA alvo; (2) Desnaturação do DNA alvo e anelamento dos primers e sondas; (3) Polimerização e geração de sinal fluorescente. V = VIC; F = FAM; Q = Quencher; MGB = *Minor Groove Binder*; Probe = Sonda.

O DNA purificado foi amplificado através de reações de PCR em tempo real com um volume final de 12,5µl, contendo 0,625µl da solução do TaqMan SNP *Genotyping Assay* 20X (900nM de cada primer e 200nM de cada sonda), 6,25µl de TaqMan *Universal PCR Master Mix* 2X (que contém TaqDNA Polimerase, deoxinucleotídeos e tampão com MgCl₂), 3,125µl de água ultrapura (*Mili-Q*[®]) e 2,5µl de DNA de cada amostra. As reações foram realizadas em equipamento ABI PRISM 7500 da *Applied Biosystems*[®] sob as seguintes condições: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 92°C por 15s e 60°C por 1min. Em todas as reações foram utilizados controles negativos, que consistiram em adicionar todos os reagentes, exceto o DNA. Após o final das reações, o *software* do aparelho gera um relatório com as curvas de amplificação da discriminação alélica de cada indivíduo (Figura 7).

Figura 7 - Curvas de amplificação de discriminação alélica por PCR em tempo real.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Ct = Ciclo *threshold*; Alelo G = Curva sem marcação; Alelo A = Curva com marcação

5.9 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada com o auxílio do Laboratório de Métodos Quantitativos do Departamento de Saúde Pública do CPqAM/Fiocruz, utilizando-se os programas estatísticos Epi-Info[®] e R[®], disponíveis no laboratório. Todos os dados foram armazenados em um banco de dados, utilizando-se o programa *Microsoft Excel*[®] (Albuquerque, EUA). As tabelas foram construídas utilizando-se o programa *Microsoft Word*[®] (Albuquerque, EUA). O teste do χ^2 ou exato de Fisher foram utilizados para comparar as variáveis qualitativas entre os grupos estudados. Para análise das variáveis quantitativas foi utilizado o teste *t-student* quando observado o pressuposto de normalidade. Quando este não foi observado, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As associações foram estimadas em *Odds Ratio* (OR), usando um intervalo de confiança (IC) de 95%. A diferença entre os resultados obtidos foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Características epidemiológicas e clínicas da população de estudo

Nesse estudo foram incluídos 256 portadores da doença de Chagas crônica, sendo destes, 66 assintomáticos e 190 portadores da cardiopatia chagásica crônica. A maioria dos indivíduos era do sexo feminino (69,9%). Quando se comparou o percentual de cada gênero entre os indivíduos sintomáticos e assintomáticos, também se observou que o sexo feminino era o mais prevalente em ambos os grupos, 70,5% e 68,2%, respectivamente. Portanto, não se observou significância estatística na variável gênero ($p=0,72$) (Tabela 1).

A idade média dos portadores da doença de Chagas crônica era de $59,3 \pm 12,0$ anos, com variação entre 27 e 91 anos. Os portadores de cardiopatia chagásica crônica apresentaram uma média de idade mais elevada ($61,0 \pm 11,2$ anos) do que a dos indivíduos assintomáticos ($54,4 \pm 12,8$ anos), sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,0002$). Ao classificar os portadores da doença de Chagas crônica por faixa etária, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011), observou-se um percentual mais elevado (53,1%) de indivíduos idosos, com 60 anos ou mais, seguido da faixa etária de adultos (39,8%), de 40 a 59 anos. Apenas 7,1% dos indivíduos eram adultos jovens, de 18 a 39 anos. Quando se comparou o percentual de cada faixa etária entre os sintomáticos e assintomáticos, foi observado que a maioria (58,4%) dos portadores de cardiopatia chagásica crônica são idosos enquanto que a maioria dos assintomáticos (42,4%) são adultos ($p=0,002$) (Tabela 1).

A maioria dos portadores da doença de Chagas crônica avaliados nesse estudo era procedente de municípios do estado de Pernambuco (86,3%). Grande parte desses municípios pertence às regiões da Zona da Mata e Agreste pernambucanos (Dados não mostrados). Os municípios de Timbaúba, Vicência, Nazaré da Mata, Bom Jardim e São Benedito do Sul foram os mais relatados, respectivamente, e corresponderam a 27,3% do total de indivíduos avaliados. No entanto, 13,7% dos portadores da doença de Chagas crônica eram procedentes de outros estados brasileiros, em geral da Paraíba ou de Alagoas.

A presença de alguns hábitos de vida entre os portadores da doença de Chagas crônica, como o de fumar (tabagismo) e ingerir álcool excessivamente (etilismo) foi questionada diretamente a cada indivíduo sob a supervisão da equipe médica do Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE. A prevalência desses hábitos de vida não apresentou diferenças estatisticamente significantes na população estudada quando se comparou o percentual deles entre os indivíduos sintomáticos e assintomáticos (Tabela 1).

Tabela 1 - Características epidemiológicas de portadores de doença de Chagas crônica atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE.

	Forma Clínica						OR (95% IC)	p
	Doença de Chagas		IND		CARD			
	n	%	n	%	n	%		
Sexo								
Masculino	77	30,1	21	31,8	56	29,5	-	-
Feminino	179	69,9	45	68,2	134	70,5	1,11 (0,61-2,04)	0,72
Faixa Etária								
18 – 39 anos	18	7,1	13	19,8	5	2,7	-	-
40 – 59 anos	102	39,8	28	42,4	74	38,9	6,87 (2,24-21,04)	0,002
≥ 60 anos	136	53,1	25	37,8	111	58,4	11,54 (3,77-35,34)	0,002
Tabagismo								
Não	226	88,3	59	89,4	167	87,9	-	-
Sim	30	11,7	7	10,6	23	12,1	1,16 (0,47-2,84)	0,74
Etilismo								
Não	227	88,7	59	89,4	168	88,4	-	-
Sim	29	11,3	7	10,6	22	11,6	1,10 (0,44-2,71)	0,82
Total	256	100	66	100	190	100		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: IND – Forma Indeterminada; CARD – Forma Cardíaca; OR – *Odds Ratio*; IC - Intervalo de Confiança

A situação trabalhista dos portadores da doença de Chagas crônica também foi questionada e observou-se que a maioria destes estavam aposentados por idade (59,4%). Além desses, 20,3% dos indivíduos estavam empregados, 9,8% estavam desempregados e 7,8% se declararam ser do lar. Um pequeno percentual de indivíduos (2,7%), não informou a situação trabalhista, sendo essa informação considerada ignorada.

Sobre a provável forma de contaminação pelo *T. cruzi*, 97,6% dos portadores da doença de Chagas crônica relataram terem tido contato com o inseto vetor da doença, ou terem residido em casas de taipa em regiões endêmicas, durante algum tempo de sua vida, sendo considerada, portanto, nesses indivíduos, a transmissão vetorial. Dois indivíduos (0,8%) relataram não conhecer o vetor da doença, nem ter residido em regiões endêmicas para a doença de Chagas. No entanto, esses indivíduos eram filhos de portadoras da doença de Chagas, sendo considerada, portanto, neles, a transmissão congênita. Quatro indivíduos (1,6%) não relataram dados favoráveis à elucidação de uma determinada forma de contaminação, sendo a informação sobre a forma de transmissão ignorada.

A fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE) é um parâmetro avaliado no ecocardiograma que mede o percentual de sangue ejetado pelo ventrículo esquerdo na sístole. Indivíduos sem patologias cardíacas apresentam valores de FEVE $\geq 55\%$. Quanto maior a disfunção cardíaca, menor será esse percentual (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Portanto a avaliação da FEVE é bastante utilizada na prática cardiológica para o acompanhamento e tratamento de portadores da doença de Chagas crônica.

Nesse estudo os indivíduos assintomáticos apresentaram média de FEVE de $66,8 \pm 5,9\%$, enquanto que os cardiopatas apresentaram uma média de FEVE de $56,6 \pm 13,4\%$, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$). Ao comparar os valores de FEVE entre os portadores de cardiopatia chagásica crônica, observou-se que o grupo CARD 1 apresentou média de $60,9 \pm 10,2\%$, enquanto que o grupo CARD 2 apresentou média de $47,6 \pm 14,7\%$, sendo também essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,005$).

Com relação ao tratamento etiológico para o *T. cruzi*, 53,9% dos portadores da doença de Chagas crônica relataram não ter realizado qualquer esquema terapêutico. O mesmo foi observado quando se comparou o percentual dos entre os indivíduos sintomáticos e assintomáticos, onde a maioria não realizou tratamento etiológico, 51,1% e 62,1%, respectivamente. Portanto, não houve diferenças estatisticamente significantes com relação ao tratamento etiológico para o *T. cruzi*, entre os indivíduos estudados ($p = 0,12$) (Tabela 2).

No presente estudo, ao analisar a prevalência de comorbidades como hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes *mellitus* e dislipidemias, foi considerada a presença dessas patologias através de diagnóstico realizado pela equipe médica do ambulatório, através de exames de rotina, ou pelo uso de tratamento específico. Entre os portadores da doença de Chagas crônica avaliados neste estudo, verificou-se que a HAS é a comorbidade mais prevalente (57,8%). Quando se comparou o percentual de cada morbidade entre os indivíduos sintomáticos e assintomáticos, não se observou nenhuma significância estatística entre os grupos de indivíduos estudados (Tabela 2).

Tabela 2 - Características clínicas de portadores de doença de Chagas crônica atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE.

	Forma Clínica						OR (95% IC)	p
	Doença de Chagas		IND		CARD			
	n	%	n	%	n	%		
Tratamento Etiológico								
Não	138	53,9	41	62,1	97	51,1	-	-
Sim	118	46,1	25	37,9	93	48,9	0,63 (0,35-1,12)	0,12
Hipertensão								
Não	108	42,2	32	48,5	76	40,0	-	-
Sim	148	57,8	34	51,5	114	60,0	1,41 (0,80-2,47)	0,22
Diabetes								
Não	227	88,7	61	92,4	166	87,4	-	-
Sim	29	11,3	5	7,6	24	12,6	1,76 (0,64-4,82)	0,26
Dislipidemia								
Não	197	76,9	54	81,8	143	75,3	-	-
Sim	59	23,1	12	18,2	47	24,7	1,47 (0,72-2,99)	0,27
Total	256	100	66	100	190	100		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: IND – Forma Indeterminada; CARD – Forma Cardíaca; OR – Odds Ratio; IC - Intervalo de Confiança

6.2 Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* nos portadores da doença de Chagas crônica

O presente estudo realizou a determinação das frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* em 256 portadores da doença de Chagas crônica. As frequências genotípicas e alélicas de ambos os SNPs encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,005$).

Em relação ao gene *IL-10*, foram encontrados os três genótipos possíveis da posição -1082G/A: 27 indivíduos GG (10,6%), 118 indivíduos GA (46,0%) e 111 indivíduos AA (43,4%). Portanto, a frequência do alelo A (66,4%), foi significativamente maior do que a frequência do alelo G (33,6%) ($p < 0,005$).

Na posição -308G/A do gene *TNF- α* , só foi encontrado um indivíduo com o genótipo AA (0,4%). Os demais apresentaram o genótipo GG (83,6%, 214 indivíduos) ou GA (16,0%, 41 indivíduos). Portanto, a frequência do alelo A (8,4%), foi significativamente menor do que a frequência do alelo G (83,6%) ($p < 0,005$).

6.3 Análise comparativa das frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* no estado de Pernambuco

A distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* na população estudada de portadores da doença de Chagas crônica foi comparada com estudos científicos (artigos, monografias, dissertações ou teses) realizados no estado de Pernambuco.

Na tabela 3 podem ser visualizadas as frequências genotípicas e alélicas do SNP -1082G/A do gene *IL-10* encontradas no presente estudo e em estudos envolvendo indivíduos com tuberculose pulmonar (MONTENEGRO, 2013), esquistossomose mansônica (VALLE NETO, 2013), leucemia linfoblástica aguda (LLA) (De DEUS; LUGO; MUNIZ, 2012) e mulheres infectadas com o papilomavírus humano (*Human Papillomavirus* – HPV) (CHAGAS *et al.*, 2013).

Tabela 3 - Comparação das Frequências Genotípicas e Alélicas do SNP -1082G/A do gene *IL-10* do presente estudo e de demais estudos realizados em Pernambuco.

	Doença de Chagas	TB	EM	LLA	HPV
	n = 256	n = 181	n = 70	n = 105	n = 171
	%	%	%	%	%
Genótipo					
GG	10,6	23	6	27	21
GA	46	37	70	48	46
AA	43,4	40	24	25	33
Alelo					
G	33,6	41,5	40,7	51	44
A	66,4	58,5	59,3	49	56

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: TB – Tuberculose; EM – Esquistossomose Mansônica; LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda; HPV - Papilomavírus Humano

Na tabela 4 podem ser visualizadas as frequências genotípicas e alélicas do SNP -308G/A do gene *TNF- α* encontradas nos portadores da doença de Chagas crônica do presente estudo e em indivíduos com tuberculose pulmonar (MONTENEGRO, 2013), esquistossomose mansônica (VALLE NETO, 2013), anemia falciforme (DOMINGOS, 2012), LLA (De DEUS; LUGO; MUNIZ, 2012), síndrome coronariana aguda (BEZERRA, 2013), diabetes *mellitus* tipo 1 (TAVARES, 2012) e lúpus eritematoso sistêmico (ANGELO *et al.*, 2012).

Tabela 4 - Comparação das Frequências Genotípicas e Alélicas do SNP -308G/A do gene *TNF- α* do presente estudo e de demais estudos realizados em Pernambuco.

	Doença de Chagas	TB	EM	AF	LLA	SCA	DM1	LES
	n = 256	n = 181	n = 70	n = 168	n = 105	n = 104	n = 171	n = 98
	%	%	%	%	%	%	%	%
Genótipo								
GG	83,6	53,5	50	78	31	73,1	77	59
GA	16	37	40	22	58	25	21	29
AA	0,4	9,5	10	-	11	1,9	2	12
Alelo								
G	91,6	72	70	89	59	85	87	73
A	8,4	28	30	11	41	15	13	27

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: TB – Tuberculose; EM – Esquistossomose Mansônica; AF – Anemia Falciforme; LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda; SCA – Síndrome Coronariana Aguda; DM1 – Diabetes *Mellitus* tipo 1; LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

6.4 Associação das frequências genótípicas e alélicas dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* com as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas crônica e com a gravidade da cardiopatia chagásica

Ao avaliar as frequências genótípicas e alélicas do SNP -1082G/A do gene *IL-10* em portadores da doença de Chagas crônica de acordo com a forma clínica, não houve diferenças significantes na distribuição das mesmas entre os indivíduos assintomáticos e os portadores de cardiopatia chagásica crônica. Também não houve diferenças estatisticamente significantes na distribuição das frequências genótípicas e alélicas entre os portadores de cardiopatia chagásica crônica (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequências Genótípicas e Alélicas do SNP -1082G/A do gene da *IL-10* em portadores de doença de Chagas crônica atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE.

Genótipo	Forma Clínica				OR (95% IC)	p	CARD1		CARD2		OR (95% IC)	p
	IND		CARD				n	%	n	%		
	n	%	n	%								
GG	8	12,2	19	10,0	-	-	11	8,6	8	12,9	-	-
GA	31	46,9	87	45,8	1,18 (0,46-2,97)	0,72	59	46,1	28	45,2	0,65 (0,24-1,80)	0,41
AA	27	40,9	84	44,2	1,30 (0,51-3,32)	0,56	58	45,3	26	41,9	0,62 (0,22-1,71)	0,35
Total	66	100	190	100			128	100	62	100		
Alelo	IND		CARD		OR (95% IC)	p	CARD1		CARD2		OR (95% IC)	p
G	n	%	n	%			n	%	n	%		
A	47	35,6	125	32,9								
A	85	64,4	255	67,1	1,12 (0,74-1,70)	0,56	175	68,4	80	64,5	0,84 (0,53-1,32)	0,45
Total	132	100	380	100			256	100	124	100		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: IND – Forma Indeterminada; CARD – Forma Cardíaca; OR – *Odds Ratio*; IC - Intervalo de Confiança

Avaliando-se as frequências genótípicas e alélicas do SNP -308G/A do gene *TNF- α* em portadores da doença de Chagas crônica de acordo com a forma clínica, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na distribuição das mesmas entre os indivíduos assintomáticos e os portadores de cardiopatia chagásica crônica. No entanto, ao analisar a distribuição das frequências genótípicas e alélicas do SNP -308G/A do gene *TNF- α* entre os portadores de cardiopatia chagásica crônica, observou-se que os indivíduos com cardiopatia chagásica leve apresentam um maior percentual do genótipo GA e do alelo A quando comparado com os portadores de cardiopatia chagásica grave (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequências Genotípica e Alélica do SNP -308G/A do gene do TNF- α em portadores de doença de Chagas crônica atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE.

	Forma Clínica											
	IND		CARD		OR (95% IC)	<i>p</i>	CARD1		CARD2		OR (95% IC)	<i>p</i>
	n	%	n	%			n	%	n	%		
Genótipo												
GG	57	86,4	157	82,6	-	-	101	78,9	56	90,3	-	-
GA	9	13,6	32	16,9	1,29 (0,58-2,87)	0,53	26	20,3	6	9,7	0,42 (0,15-1,04)	0,030
AA	-	-	1	0,5			1	0,8	-	-		
Total	66	100	190	100			128	100	62	100		
Alélo												
G	123	93,2	346	91,1	-	-	228	89,1	118	95,2	-	-
A	9	6,8	34	8,9	1,34 (0,62-2,88)	0,44	28	10,9	6	4,8	0,41 (0,14-0,99)	0,034
Total	132	100	380	100			256	100	124	100		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: IND – Forma Indeterminada; CARD – Forma Cardíaca; OR – *Odds Ratio*; IC - Intervalo de Confiança

7 DISCUSSÃO

7.1 Características epidemiológicas e clínicas da população de estudo

No estado de Pernambuco não estão disponíveis dados recentes, sobre o perfil dos portadores da doença de Chagas, exceto pelo trabalho de Melo *et al.* (2009) que realizou um estudo com os indivíduos candidatos a serem doadores de sangue, mas que apresentaram sorologia reagente para infecção pelo *T. cruzi* no hemocentro do estado. Apesar de sua importância epidemiológica, o estudo não traz informações clínicas acerca dos portadores da doença de Chagas no estado. Foi, portanto, um dos objetivos desta tese realizar uma análise epidemiológica e clínica dos portadores da doença de Chagas crônica selecionados para avaliação dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE.

Nesse estudo foram incluídos 256 portadores da doença de Chagas crônica, sendo destes, 66 assintomáticos e 190 com cardiopatia chagásica crônica. Estudos sobre portadores da doença de Chagas crônica realizados em outros hospitais universitários brasileiros também demonstraram um número mais elevado de indivíduos com a forma cardíaca (ALMEIDA *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2009; BERTANHA *et al.*, 2008; BOZELLI *et al.*, 2006). O número reduzido de assintomáticos pode ser explicado devido ao fato desses indivíduos não comparecerem com frequência ao ambulatório para consultas regulares. Este fato provavelmente ocasionou sua captação diminuída, apesar de, segundo a literatura, existir um número maior de portadores da doença de Chagas assintomáticos (DIAS *et al.*, 2008).

Dos portadores da doença de Chagas selecionados, aproximadamente 70% são do sexo feminino. Em estudos realizados no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, também foi encontrada uma prevalência maior do sexo feminino (ALMEIDA *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2009). No entanto, no Hospital Universitário de Maringá e no Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, entre os portadores da doença de Chagas se observou uma maior prevalência do sexo masculino (BOZELLI *et al.*, 2006; POMPILIO *et al.*, 2005). Segundo a Fundação Nacional de Saúde não existe correlação entre o gênero e a sorologia para a doença de Chagas, pois ela afeta indistintamente homens e mulheres. No entanto, essa predominância de portadores da doença de Chagas do sexo feminino, encontrada no presente estudo, é atribuída por alguns autores como resultado de diferenças culturais nos cuidados com a saúde, que atribui às mulheres uma maior demanda de uso dos serviços de saúde ambulatoriais e hospitalares (MORAES-SOUZA *et al.*, 2006).

A idade dos portadores da doença de Chagas analisados nesse estudo variou de 27 a 91 anos com média de $59,3 \pm 12$ anos. Ao estratificar os indivíduos por faixas etárias obtiveram-se maiores percentuais de idosos e de indivíduos adultos, aproximadamente 53% e 40%, respectivamente. Tendências semelhantes de distribuição etária entre portadores da doença de Chagas crônica foram observadas por Pompilio *et al.* (2005) e Bozelli *et al.* (2006). Segundo Lunardelli *et al.* (2007) pode-se atribuir a atual redução nos níveis de infecção chagásica em indivíduos jovens como reflexo das medidas para o controle vetorial, ocorridas no passado.

Os hábitos de tabagismo e etilismo foram relatados, respectivamente, por 11,7% e 11,3% dos portadores da doença de Chagas crônica desse estudo. Esses percentuais diferem dos encontrados por Bertanha *et al.* (2008), onde 40% dos indivíduos relataram tabagismo e 44% etilismo. No entanto, assim como nesse estudo, não houve diferença entre a frequência desses hábitos entre indivíduos assintomáticos e portadores de cardiopatia chagásica crônica.

Aproximadamente 60% dos portadores da doença de Chagas crônica ao serem questionados sobre sua situação trabalhista relataram estar aposentados. Alves *et al.* (2009), também observaram um elevado percentual (73%) de indivíduos portadores da doença de Chagas aposentados. Os autores atribuem essa situação ao envelhecimento da população infectada pelo *T. cruzi*, e não ao fato da sorologia reagente para doença de Chagas ter sido no passado motivo de afastamento do mercado de trabalho de muitos indivíduos, o que atualmente é proibido pela legislação brasileira (OLIVEIRA Jr, 1996).

A transmissão vetorial foi a provável forma de contaminação pelo *T. cruzi*, na maioria dos portadores da doença de Chagas crônica analisados nesse estudo. Resultado semelhante foi encontrado no estudo Pompilio *et al.* (2005), onde a maioria dos indivíduos relatou ter residido em áreas rurais endêmicas para a doença de Chagas, conhecer o vetor da doença e/ou ter coabitado com eles. Apesar desse mecanismo de transmissão estar sobre aparente controle no Brasil, esses achados ressaltam a importância dessa forma de contaminação no passado, antes da elaboração de medidas para seu controle e prevenção.

Alguns autores acreditam que a administração da terapia antiparasitária nos indivíduos assintomáticos previne o desenvolvimento da cardiopatia, apesar de não ocorrer erradicação completa do parasita (GARCIA *et al.*, 2005). No entanto, a obrigação do tratamento etiológico só ocorre nos casos agudos, sendo uma opção pessoal de cada médico e de seu paciente a realização do tratamento etiológico na fase crônica da doença de Chagas (BRASIL, 2005). Esse fato explica os resultados encontrados no presente estudo e no de Bozelli *et al.* (2006), com relação ao tratamento etiológico para o *T. cruzi*, onde a maioria não o realizou, apesar de não terem existido diferenças significantes, em relação à adesão ao tratamento.

Ao se avaliar a presença de comorbidades entre os portadores da doença de Chagas crônica avaliados neste estudo verificou-se um elevado percentual, aproximadamente 58%, de portadores de HAS. Diversos estudos também relataram a HAS como a comorbidade mais prevalente entre os indivíduos portadores da doença de Chagas (ALMEIDA *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2009; BERTANHA *et al.*, 2008; BOZELLI *et al.*, 2006; POMPILIO *et al.*, 2005). Apesar do grande número de portadores da doença de Chagas que apresentam HAS, não se constatou uma associação de causa e efeito entre essas duas patologias. Alguns autores consideram que como a HAS está relacionada com a atividade do sistema nervoso simpático e com o funcionamento cardíaco, e ambos podem ser afetados pela infecção causada pelo *T. cruzi*, haveria a possibilidade de que os fatores patogênicos da infecção chagásica contribuíssem para a elevação pressórica (BOZELLI *et al.*, 2006). No entanto, há bastante divergência quanto à prevalência da HAS entre os indivíduos portadores da doença de Chagas, e não há relação entre sua presença e as formas clínicas da doença, o que também foi observado no presente estudo, onde percentuais semelhantes foram observados entre os indivíduos assintomáticos e os portadores de cardiopatia chagásica crônica. A associação frequente entre a doença de Chagas e a HAS deve considerar o envelhecimento da população em geral, o que por si só aumenta a prevalência da HAS (BERTANHA *et al.*, 2008). Particularmente na população portadora da doença de Chagas, que nesse estudo foi composta em sua maioria por indivíduos idosos, esse achado deve ser esperado, pelo aumento da média de idade dos indivíduos infectados, devido ao sucesso das campanhas de controle vetorial e das melhorias da abordagem diagnóstica e terapêuticas.

Outras comorbidades comumente encontradas entre os portadores da doença de Chagas crônica avaliados nesse estudo foram a dislipidemia e o diabetes *mellitus*, respectivamente 23,% e 11,3%. Prevalências bastante semelhantes a esse estudo foram encontradas também por Bozelli *et al.* (2006), Bertanha *et al.* (2008) e Alves *et al.* (2009), que, no entanto, não diferem da prevalência dessas morbidades na população brasileira em geral. Também não se observa diferenças entre a prevalência dessas comorbidades entre os indivíduos assintomáticos e os portadores de cardiopatia chagásica crônica

7.2 Avaliação dos SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α*

No presente estudo procurou-se avaliar a distribuição de dois SNPs, um relativo a uma importante citocina imunoreguladora, a IL-10, na posição -1082 (rs1800896) da região promotora de seu gene e o outro foi o SNP presente na posição -308 (rs1800629) do gene do TNF- α , uma importante citocina com ação pró-inflamatória, ambos em portadores da doença de Chagas crônica. A escolha dos alvos utilizados neste trabalho foi baseada nas associações existentes entre os produtos desses genes, e a doença de Chagas crônica, pois estas citocinas apresentam diferenças em sua expressão e seus níveis séricos, entre as diferentes formas clínicas da doença (BRAZ *et al.*, 2013; CUNA *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2003; LORENA *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2012; PÉREZ-FUENTES *et al.*, 2003; TALVANI *et al.*, 2004).

A avaliação da distribuição desses SNPs teve como objetivo principal avaliar se existiam diferenças nas frequências genótípicas e alélicas dos mesmos entre as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas crônica e entre a gravidade da cardiopatia chagásica crônica. O estabelecimento de marcadores genéticos de evolução e prognóstico pode ser de bastante utilidade no futuro, no acompanhamento ambulatorial dos portadores da doença de Chagas crônica, visto que a classificação atual das formas clínicas é realizada principalmente através do eletrocardiograma, do ecocardiograma e das radiografias, partindo da anamnese do paciente (BRASIL, 2005). A investigação de alterações precoces do sistema cardíaco, através desta avaliação convencional, é inadequada, porque ela apenas revela a atual situação clínica do indivíduo, quando as alterações patológicas já estão estabelecidas (OLIVEIRA Jr., 2009).

Algumas técnicas e testes prognósticos mais sensíveis vêm sendo estudados, ao longo dos últimos anos, para detectar e acompanhar o desenvolvimento de alterações cardíacas em indivíduos portadores da doença de Chagas crônica assintomáticos. A maioria dos grupos de pesquisa tenta estabelecer marcadores biológicos de evolução e prognóstico da doença através de mecanismos imunológicos (ABEL *et al.*, 2001; BARROS-MAZON *et al.*, 2004; BRAZ *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2005; LORENA *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2010; VERÇOSA *et al.*, 2007). De acordo com os resultados previamente encontrados, os marcadores biológicos para a doença de Chagas crônica baseados em células e moléculas da imunidade celular parecem ser bastante promissores por terem um importante papel na evolução da infecção chagásica.

As descobertas recentes sobre o papel da IL-10, na doença de Chagas crônica têm feito esta citocina alvo de diversos estudos sobre seus níveis séricos, expressão gênica e polimorfismos genéticos. A secreção local e sistêmica da IL-10 nos portadores da doença de Chagas crônica assintomáticos tem um papel antiinflamatório e regulatório para manutenção da situação “estável” desses indivíduos (CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1999; CUNA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003). Os portadores da doença de Chagas assintomáticos apresentam níveis mais elevados de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), secretoras de IL-10, quando comparados com os níveis de portadores de cardiopatia chagásica crônica (BRAZ *et al.*, 2013; SILVEIRA *et al.*, 2009; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005). Uma diminuição dos níveis desta citocina foi observada em portadores de cardiopatia chagásica crônica, com uma correlação com a gravidade do dano cardíaco, avaliada através da FEVE do ecocardiograma (COSTA *et al.*, 2009).

Neste trabalho, o gene *IL-10* foi genotipado, em portadores da doença de Chagas crônica, na posição -1082G/A, e foi possível encontrar entre os indivíduos estudados, os três genótipos possíveis da posição, sendo a maioria de heterozigotos (46,0%), seguido de homozigotos para o alelo A (43,4%) e apenas 10,6% de homozigotos para o alelo G. Foi evidenciado, portanto, que o alelo A é significativamente mais frequente (66,4%) na população estudada ($p < 0,005$).

Essa elevada frequência do alelo A encontrada no presente estudo, também pôde ser observada em outros estudos que avaliaram o SNP -1082G/A do gene *IL-10* no estado de Pernambuco. Os estudos conduzidos por Montenegro (2013), com indivíduos com tuberculose pulmonar, Valle Neto (2013) com portadores de esquistossomose mansônica e Chagas *et al.* (2013), com mulheres infectadas com HPV, também relataram uma maior frequência do alelo A. Além disso, a distribuição genotípica desses estudos também demonstrou a mesma tendência observada no presente estudo, onde um percentual maior de indivíduos GA foi seguido de indivíduos AA e menores frequências de indivíduos GG. No estudo conduzido por De Deus, Lugo e Muniz (2012) com crianças portadoras de LLA, a distribuição das frequências genotípicas e alélicas diferiram um pouco dos demais estudos realizado no estado de Pernambuco, pois foi encontrado um percentual semelhante entre os alelos G e A, respectivamente 51% e 49%, refletido pela elevada presença do genótipo GG (27%). No entanto, nesse estudo o percentual de heterozigotos foi o maior dentre os demais genótipos (48%), como previamente encontrado nos outros estudos anteriormente relatados. As frequências genotípicas e alélicas do SNP -1082G/A do gene *IL-10* seguem, portanto, uma distribuição semelhante em todo o estado.

Ao dividir os portadores da doença de Chagas crônica de acordo com a forma clínica, não se observou diferenças significantes na distribuição das frequências genóticas e alélicas do SNP -1082G/A do gene *IL-10*. A tendência encontrada na população como um todo, percentual maior de indivíduos heterozigotos, seguido de indivíduos homozigotos para o alelo A, menor frequência de indivíduos homozigotos para o alelo G e uma maior frequência do alelo A, permaneceu a mesma quando se comparou os indivíduos assintomáticos com os portadores de cardiopatia chagásica crônica.

Resultados semelhantes ao desse estudo foram também encontrados por Flórez *et al.* (2011) em uma população colombiana. Os autores analisaram não só o SNP na posição -1082 do gene *IL-10*, mas também as posições -819C/T e -592A/C e não observaram diferenças estatisticamente significativas nas frequências genóticas e alélicas de nenhum destes SNPs entre os indivíduos com cardiopatia chagásica crônica e assintomáticos. Apesar de ter sido realizado em uma população com diferentes *backgrounds* étnicos e genéticos, o estudo de Flórez *et al.* (2011) encontrou frequências genóticas e alélicas do SNP -1082G/A do gene *IL-10* bastante parecidas com as do presente estudo.

Costa *et al.* (2009) analisaram o SNP -1082G/A do gene *IL-10* em uma população brasileira do estado de Minas Gerais e observaram que esse SNP não seguiu um padrão de distribuição das frequências genóticas e alélicas entre os portadores da doença de Chagas. Uma diferença foi observada entre os indivíduos com cardiopatia chagásica crônica e assintomáticos em relação à ocorrência do alelo A, de fenótipo baixo produtor da IL-10, sendo este mais presente nos indivíduos cardiopatas. Esses achados discordam do encontrado no presente estudo, apesar disso, concordam com os estudos de expressão gênica, produção por células do sistema imune e níveis séricos da IL-10 em portadores da doença de Chagas, que atribuem níveis mais elevados dessa citocina aos indivíduos assintomáticos (BRAZ *et al.*, 2013; CUNA *et al.*, 2000; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005).

No entanto, esses resultados encontrados por Costa *et al.* (2009) devem ser reproduzidos em outras populações endêmicas para a doença de Chagas e com um número maior de indivíduos, visto que amostra reduzida de seu estudo (155 indivíduos, sendo 58 assintomáticos e 97 cardiopatas) pode ter sido um fator favorável a obtenção desse resultado pelos autores. Já foi relatado que o alelo G, assim como o genótipo GG é mais frequente em populações brancas (KOCH *et al.*, 2001), portanto a associação entre os genótipos e alelos pode variar de acordo com a etnia, especialmente na população brasileira, que é altamente miscigenada. Os resultados encontrados no presente estudo podem, portanto, refletir melhor a miscigenação de americanos nativos, europeus e africanos encontrada no Brasil.

Ao analisar a distribuição das frequências genotípicas e alélicas do SNP -1082G/A do gene *IL-10* entre os portadores de cardiopatia chagásica crônica avaliados no presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os cardiopatas leves e graves. Em seu estudo, Costa *et al.* (2009) também analisaram os portadores de cardiopatia chagásica crônica, estratificados pelo grau de lesão cardíaca em não-dilatados e com dilatação cardíaca e também não observaram diferenças nas frequências genotípicas e alélicas entre eles. Apesar dos mesmos autores terem demonstrado uma correlação entre os baixos níveis de expressão de IL-10 e baixos valores de FEVE, esses achados sugerem que o *background* genético da IL-10 não atua como um fator que poderia influenciar na patogênese da cardiopatia chagásica crônica. Mecanismos imunológicos, como uma proliferação celular exarcebada, podem estar atuando para compensar a baixa produção de IL-10 pelas células dos indivíduos portadores do alelo A. Essa seria uma razão para a falta de correlação entre o fenótipo e o genótipo da IL-10 observada por Costa *et al.* (2009). Essa ausência de associação entre o SNP -1082G/A do gene *IL-10* e os níveis de produção e expressão dessa citocina na cardiopatia chagásica crônica, no entanto, não diminuem o importante papel dessa citocina da imunopatogênese da doença de Chagas, previamente demonstrado através de estudos imunológicos (BRAZ *et al.*, 2013; CUNA *et al.*, 2000; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005).

Alguns estudos demonstraram que os níveis séricos e/ou plasmáticos do TNF- α estão elevados em portadores da doença de Chagas quando comparados com indivíduos não portadores da doença. Além disso, vem sendo observado que níveis elevados de expressão gênica do gene *TNF- α* e da produção desta citocina por leucócitos tem relação com a evolução da forma assintomática para as formas sintomáticas. A produção e secreção local e sistêmica do TNF- α vem sendo associada ao desenvolvimento e a gravidade da cardiopatia chagásica crônica, sugerindo a participação desta citocina na formação da inflamação crônica e na lesão cardíaca (FERREIRA *et al.*, 2003; LORENA *et al.*, 2008; LORENA *et al.*, 2010; PERÉZ-FUENTES *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 1993; TALVANI *et al.*, 2004).

No presente trabalho, portadores da doença de Chagas crônica tiveram o SNP -308G/A de gene *TNF- α* genotipado através de PCR em tempo real. O genótipo homozigoto para o alelo G foi o mais prevalente (83,6%), enquanto que 16,0% dos indivíduos estudados eram heterozigotos. Apenas um indivíduo apresentou o genótipo homozigoto para o alelo A, portanto, foi evidenciado que o alelo A é significativamente menos frequente (8,4%) na população estudada ($p < 0,005$).

A baixa frequência do alelo A encontrada no presente estudo, também foi observada em outros estudos que avaliaram o SNP -308G/A de gene *TNF- α* em Pernambuco. Estudos conduzidos com indivíduos com tuberculose pulmonar (MONTENEGRO, 2013), esquistossomose mansônica (VALLE NETO, 2013), anemia falciforme (DOMINGOS, 2012), síndrome coronariana aguda (BEZERRA, 2013), diabetes *mellitus* tipo 1 (TAVARES, 2012) e lúpus eritematoso sistêmico (ANGELO *et al.*, 2012) também relataram uma menor frequência do alelo A em suas populações de estudo. A tendência da distribuição genotípica do SNP -308G/A de gene *TNF- α* nesses estudos foi semelhante à observada no presente estudo, onde os indivíduos GG representaram o maior percentual, seguido de indivíduos GA e com frequências reduzidas de indivíduos AA. No entanto, De Deus, Lugo e Muniz (2012) também avaliaram o SNP -308G/A de gene *TNF- α* em crianças com LLA, e relataram um percentual semelhante da frequência dos alelos G e A, 59% e 41%, respectivamente. Essa alta frequência do alelo A, diferente dos outros estudos realizados no estado foi encontrada devido à elevada presença de crianças portadoras do genótipo GA (58%). No entanto, nesse estudo o percentual de homozigotos para o alelo A foi reduzido (11%), assim como também foi encontrado nos estudos relatados. Portanto, o genótipo AA do SNP -308G/A do gene *TNF- α* segue uma distribuição semelhante em todo o estado de Pernambuco, com baixa frequência e que condiz com a baixa prevalência do alelo A encontrada nesse estudo e na maioria dos aqui citados.

Ao avaliar as frequências genotípicas e alélicas do SNP -308G/A do gene *TNF- α* entre os portadores da doença de Chagas crônica de acordo com a forma clínica, não se observou diferenças estatisticamente significantes na distribuição das mesmas entre os indivíduos assintomáticos e os portadores de cardiopatia chagásica crônica. A mesma tendência encontrada na população geral de portadores da doença de Chagas crônica, percentual majoritário de indivíduos homozigotos para o alelo G e menor frequência de heterozigotos, foi observada ao comparar os indivíduos assintomáticos com os portadores de cardiopatia chagásica crônica. É importante ressaltar que apenas um indivíduo apresentou o genótipo homozigoto para o alelo A, sendo ele portador da cardiopatia chagásica crônica. Portanto, não foram observados indivíduos assintomáticos com o genótipo AA.

Um estudo realizado com portadores da doença de Chagas crônica peruanos conduzido por Beraún *et al.* (1998) avaliaram os SNPs -308G/A e -238G/A da região promotora do gene *TNF- α* . No entanto, os autores não encontraram associação de nenhum desses SNPs com o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica. Pissetti *et al.* (2011) estudaram, recentemente, os mesmos SNPs do gene *TNF- α* em uma população brasileira do

estado de Minas Gerais e também não observaram nenhuma associação significativa entre esses SNPs e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas. Resultados semelhantes foram encontrados por Drigo *et al.* (2007) ao avaliar o papel do SNP -308G/A do gene *TNF- α* entre indivíduos assintomáticos e portadores de cardiopatia chagásica crônica residentes no Brasil, no estado de São Paulo. Os autores não observaram diferenças estatisticamente significantes nas frequências genotípicas e alélicas desse gene entre os portadores da doença de Chagas crônica estudados. Todos esses estudos citados corroboram os resultados encontrados no presente estudo, onde não foi possível estabelecer associações entre os genótipos e alelos do SNP -308G/A do gene *TNF- α* e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas.

No entanto, conclusões diferentes a cerca do papel do gene *TNF- α* na doença de Chagas crônica foram obtidas por Rodríguez-Pérez *et al.* (2005) e Criado *et al.* (2012). Rodríguez-Pérez *et al.* (2005) avaliaram ambos os SNPs -308G/A e -238G/A da região do gene *TNF- α* numa população mexicana e obtiveram resultados diferentes para cada SNP. Em relação à posição -238G/A, assim como Beraún *et al.* (1998) e Pissetti *et al.* (2011), os autores não encontraram diferenças nas frequências genotípicas e alélicas desse SNP entre indivíduos assintomáticos e cardiopatas chagásicos crônicos. Portanto, a falta de associação entre o SNP -238G/A do gene *TNF- α* e as formas clínicas da doença de Chagas crônica foi evidenciada por todos os estudos executados até o presente momento, o que sugere que este SNP não tem relação com a expressão e produção do *TNF- α* nessa doença. Contudo, Rodríguez-Pérez *et al.* (2005) também avaliaram o SNP -308G/A do gene *TNF- α* e, sugerem que o SNP nesta posição poderia ser um marcador genético envolvido as manifestações cardíacas da doença de Chagas crônica, visto que o grupo de portadores de cardiopatia chagásica crônica estudados apresentou uma frequência aumentada estatisticamente significativa do alelo A e dos genótipos GA e AA, quando comparada com a frequência dos indivíduos assintomáticos.

Resultados semelhantes ao de Rodríguez-Pérez *et al.* (2005) foram relatados por Criado *et al.* (2012) ao analisar o SNP -308G/A do gene *TNF- α* em uma população de portadores da doença de Chagas da Colômbia. Os autores também encontraram uma frequência elevada do alelo A, relacionado com a alta produção do *TNF- α* , nos portadores de cardiopatia chagásica crônica e estatisticamente significativa quando comparada com a frequência do mesmo alelo nos indivíduos assintomáticos. Os autores corroboram os dados de Rodríguez-Pérez *et al.* (2005) e sugerem que o SNP nesta posição possa ter uma relação com a produção do *TNF- α* , que é de suma importância para o estabelecimento da inflamação crônica cardíaca que culmina com o desenvolvimento das lesões características da cardiopatia chagásica crônica (CRIADO *et al.*, 2012).

Apesar de se mostrarem promissores, os resultados de Rodríguez-Pérez *et al.* (2005) e Criado *et al.* (2012) devem ser reproduzidos em outros países endêmicos para a doença de Chagas. Além disso, um número maior de indivíduos deve ser analisado, pois o estudo de Rodríguez-Pérez *et al.* (2005) analisou uma amostra bastante reduzida (54 indivíduos), o que pode ter influenciado a distribuição das frequências genotípicas e alélicas avaliadas pelos autores. Diferenças na estrutura étnica e genética das populações estudadas podem ser a razão para os diferentes achados em relação ao gene *TNF- α* e a susceptibilidade a cardiopatia chagásica crônica. Os resultados encontrados no presente estudo, no entanto, confirmam os achados dos estudos de Drigo *et al.* (2007) e Pissetti *et al.* (2011), ambos realizados em populações do sudeste brasileiro. A população brasileira, apesar de ser altamente miscigenada, não apresentou diferenças significantes na distribuição do alelo A do SNP -308G/A do gene *TNF- α* , que esteve presente em um baixo percentual em todos os estudos realizados com portadores da doença de Chagas crônica. Essa seria uma evidência da falta de associação deste SNP com as diferentes formas clínicas crônicas da doença.

Estudos conduzidos com outras doenças cardiológicas não infecciosas, como a doença arterial coronariana e a síndrome coronariana aguda, também não conseguiram demonstrar associação entre o SNP -308G/A do gene *TNF- α* e a susceptibilidade a essas doenças do coração, apesar de ambas também serem doenças crônicas inflamatórias, onde o *TNF- α* já havia sido previamente relacionado com seu acometimento (BABU *et al.*, 2012; BEZERRA, 2013; CHU *et al.*, 2012). Esses achados, juntamente com os encontrados nos estudos realizados com portadores da doença de Chagas crônica, indicam que variações genéticas no gene *TNF- α* não são determinantes do desenvolvimento das doenças cardíacas.

Apesar do importante papel do *TNF- α* na cardiopatia chagásica crônica, já estabelecido por estudos imunológicos (FERREIRA *et al.*, 2003; LORENA *et al.*, 2010; PERÉZ-FUENTES *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 1993; TALVANI *et al.*, 2004), nenhum estudo, até o presente momento, avaliou a distribuição das frequências genotípicas e alélicas do SNP -308G/A do gene *TNF- α* entre os portadores de cardiopatia chagásica crônica de acordo com a gravidade das manifestações. No presente estudo, realizou-se a estratificação dos portadores de cardiopatia chagásica crônica, com base na presença ou não de dilatação cardíaca, em cardiopatia grave e leve, respectivamente. Ao analisar as frequências genotípicas e alélicas do SNP -308G/A do gene *TNF- α* observou-se que os indivíduos com cardiopatia chagásica leve apresentam um maior percentual do genótipo GA e do alelo A quando comparado com os portadores de cardiopatia chagásica grave. Essa diferença na distribuição dos genótipos e alelos foi estaticamente significativa e pelos valores de OR (0,42 e 0,41, respectivamente)

pode se acreditar que a presença desse genótipo e desse alelo atuaria como um fator de proteção para o desenvolvimento da cardiopatia chagásica grave. A vantagem da heterozigose é um mecanismo mais eficiente de responder as exigências do meio, já que indivíduos heterozigotos possuem uma variedade genética que lhes permite se adaptar a condições adversas (COOKE; HILL, 2001; HEDRICK *et al.*, 1990). No caso do gene do *TNF- α* , a presença de ambos os alelos pode conferir uma adaptação à produção desta citocina, cuja secreção pode ser benéfica inicialmente, no entanto, uma superprodução pode causar dano tecidual generalizado (WANG *et al.*, 2003). Esses achados sugerem que o *background* genético do hospedeiro pode ser um fator que influencia no desfecho da cardiopatia chagásica crônica. Com base nessas evidências, pode se sugerir que, com relação ao SNP -308G/A do gene *TNF- α* , a patogênese da cardiopatia chagásica crônica envolve distintos mecanismos genéticos, e que determinados genótipos podem culminar com a dilatação cardíaca ou com sua proteção. Contudo, estudos adicionais, prospectivos, que realizem o acompanhamento dos portadores de cardiopatia chagásica, após determinação de seus genótipos, devem ser conduzidos para testar essa hipótese.

8 CONCLUSÕES

- a) Não há associação das variáveis epidemiológicas e clínicas estudadas com a susceptibilidade e o desenvolvimento da doença de Chagas crônica;
 - b) Os SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* possuem uma distribuição homogênea, não aleatória, no estado de Pernambuco;
 - c) Os SNPs -1082G/A do gene *IL-10* e -308G/A do gene *TNF- α* não atuam como marcadores genéticos das formas clínicas crônicas da doença de Chagas;
 - d) O SNP -1082G/A do gene *IL-10* não contribui com a gravidade das manifestações clínicas da cardiopatia chagásica crônica;
 - e) A presença do alelo A e do genótipo GA do SNP -308G/A do gene *TNF- α* em portadores de cardiopatia chagásica crônica pode atuar como um fator de proteção para o desenvolvimento da cardiopatia chagásica grave.
-
-

9 PERSPECTIVAS

- a) Avaliar a distribuição das frequências genóticas e alélicas do SNP -308G/A do gene *TNF- α* em portadores de cardiopatia chagásica crônica, estratificados em cardiopatia leve, moderada e grave, através da FEVE do ecocardiograma.
 - b) Selecionar um número maior de portadores de cardiopatia chagásica crônica, com o intuito de confirmar o papel do SNP -308G/A do gene *TNF- α* na gravidade da cardiopatia.
-
-

REFERÊNCIAS

- ABEL, L. C. J. *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, London, v. 17, p. 99–108, 2001.
- ALMEIDA, E. A. *et al.* Apresentação clínica da doença de Chagas crônica em indivíduos idosos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 311-315, 2007.
- ALVES, R. M. A. *et al.* Chagas' disease and ageing: the coexistence of other chronic diseases with Chagas' disease in elderly patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 42, n. 6, p. 662-628, 2009.
- ANDRADE, Z. A. Patologia e Patogenia. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. p. 27-38.
- ANGELO, H. D. *et al.* Tumor necrosis fator alpha promoter polymorphism -308G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Human Immunology**, New York, v. 73, n. 11, p. 1166-1170, 2012.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **TaqMan SNP Genotyping Assay**. Foster City, 2011.
- ARAÚJO, F. F. *et al.* Potential role of CD4⁺CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 1, n. 12, p. 2797-2806, 2007.
- BABU, B. M. V. S. *et al.* Cytokine gene polymorphisms in the susceptibility to acute coronary syndrome. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, New York, v. 16, n. 5, p. 359-365, 2012.
- BARBOSA, L. G. N. Doença de Chagas. **Revista Logos**, Rio de Janeiro, v. 17, p. 20-36, 2009.
- BARROS-MAZON S. *et al.* Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 111, p. 137–145, 2004.
- BERAÚN, Y. *et al.* Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 52, p. 81–83, 1998.

BERTANHA, L. *et al.* Caracterização clínico-laboratorial de chagásicos hipertensos sem insuficiência cardíaca manifesta. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 163-168, 2008.

BEZERRA, M. J. R. **Avaliação da associação de polimorfismos nos genes do TNF- α e do receptor de leptina com a Síndrome Coronariana Aguda em pacientes do Real Hospital Português – PE.** 2013. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2013.

BOZELLI, C. E. *et al.* Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com doença de Chagas no Hopsital Universitário de Maringá, Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 5, p. 1027-1034, 2006.

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

BRAZ, S. C. M. *et al.* Chagas disease in the State of Pernambuco, Brazil: analysis of admissions and mortality time series. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 318-322, 2011.

BRAZ, S. C. M. *et al.* Evaluation of CD4⁺CD25⁺ T lymphocyte response time kinetics in patients with chronic Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 46, n. 2, p. 362-366, 2013.

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

CALZADA, J. E. *et al.* Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 58, p. 154–158, 2001.

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

CASTRO, C. *et al.* Estudo radiológico longitudinal do esôfago, em área endêmica de doença de Chagas, em um período de 13 anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 227-233, 1994.

CHAGAS, B. S. *et al.* An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 19, p. 32-37, 2013.

CHOMARAT, P. *et al.* Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 177, p. 523–527, 1993.

CHU, H. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha G-308A polymorphism and risk of coronary heart disease and myocardial infarction: A case-control study and meta-analysis. **Journal of Cardiovascular Disease Research**, v. 3, n. 2, p. 84-90, 2012.

COOKE, G. S.; HILL, A. V. Genetics of susceptibility to human infectious disease. **Nature Reviews**, London, v. 2, p. 967-977, 2001.

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

COSTA, G. C. *et al.* Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 199, p. 451-454, 2009.

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

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

CRUZ-ROBLES, D. *et al.* MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease. **Human Immunology**, New York, v. 65, p. 60-65, 2004.

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

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

DEGHAIDE, N. H. S. *et al.* HLA class I and class II profiles of patients presenting with Chagas Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 43, p. 246-252, 1998.

De DEUS, D. M. V.; LUGO, K. A.; MUNIZ, M. T. C. Influence of IL10 (G1082A) and TNF α (G308A) polymorphisms on the survival of pediatric patients with ALL. **Leukemia Research and Treatment**, Oxford, v. 69, n. 23, p. 4-8, 2012.

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

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

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

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

DOMINGOS, I. F. **Características moleculares de pacientes com anemia falciforme e acidente vascular cerebral**. 2012. Monografia (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

DRIGO, S. A. *et al.* TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, p. 598–603, 2006.

DRIGO, S. A. *et al.* Lack of association of tumor necrosis factor- α polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 108, p. 109–111, 2007.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES initiative. **Doenças Negligenciadas**. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx> Acesso em: 24 ago, 2011.

DUSSAULT, A. A. *et al.* Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, Waterloo, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2006.

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

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

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

FERREIRA, R. C. *et al.* Increased Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor- α in Asymptomatic/“Indeterminate” and Chagas Disease Cardiomyopathy Patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 407-411, 2003.

FIorentino, D. F. *et al.* Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 170, p. 2081–2095, 1989.

FLÓREZ, O. *et al.* Interleukin 4, interleukin 4 receptor- α and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 33, p. 506-511, 2011.

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

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

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

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

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

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

GRAY, I. C. *et al.* Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 9, n. 16, p. 2403-2408, 2000.

HEDRICK, P. W. *et al.* Evolution at HLA: possible explanations for the deficiency of homozygotes in two populations. **Human Heredity**, Basel, v. 40, p. 213-230, 1990.

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

IBGE. **Censo demográfico de 2010**. Rio de Janeiro, 2011.

JOHNSON, V. J. *et al.* Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. **Cytokine**, San Diego, v. 27, p. 135-141, 2004.

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

KOCH, K. *et al.* Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infection. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 159, p. 137-144, 2001.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford, v. 27, p. 95–125, 2006.

KUBISTOVA, Z. *et al.* Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. **Biomedical papers of the medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic**, Prague, v. 153, n. 2, p. 93-102, 2009.

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

LAYRISSE, Z. *et al.* HLAC* 03 is a risk factor for cardiomyopathy in Chagas disease. **Human Immunology**, New York, v. 61, n. 925-929, 2000.

LLOP, E. *et al.* HLA antigens in cardiomyopathic Chilean Chagasics. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 43, p. 770-773, 1988.

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

LORENA, V. M. B. *et al.* Cytokine levels in serious cardiopathy of Chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 72, p. 529–539, 2010.

LUNARDELLI, A. *et al.* Soroprevalência da doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 139-141, 2007.

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

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Epidemiology to mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e1508, 2012.

MELO, A. S. *et al.* Prevalência de infecção chagásica em doadores de sangue no estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 69-73, 2009.

MELO, A. S. *et al.* IL-10 and IFN- γ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine**, San Diego, v. 58, n. 2, p. 207-212, 2012.

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

MONTENEGRO, L. M. L. **Avaliação da associação de polimorfismos de base única em região promotora de genes das citocinas fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-10 (IL-10) com a susceptibilidade ou resistência a tuberculose pulmonar.** 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2013.

MORAES-SOUZA, H. *et al.* Perfil sorológico para doença de Chagas dos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberaba. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 110-114, 2006.

NIETO, A. *et al.* HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 55, p. 195-198, 2000.

NOVAIS, C. M. *et al.* PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 10-13, 2005.

NUSSBAUM R. L. *et al.* Variação Genética em Indivíduos: Mutação e Polimorfismo. In: _____. **Genética Médica**: Thompson & Thompson. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 47-62.

OLIVEIRA, M. A. C. *et al.* Fatores Biológicos e Superestimação da Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo no *Gated* SPECT. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 90, n. 5, p. 333-338, 2008.

OLIVEIRA Jr., W. Forma indeterminada da Doença de Chagas. Implicações médico-trabalhistas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 54, n. 2, p. 89-91, 1996.

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

OLLIER, W. E. R. Cytokine genes and disease susceptibility. **Cytokine**, San Diego, v. 28, p. 174-178, 2004.

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

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

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

PISSETI, C. W. *et al.* Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. 96-97, 2011.

POMPILIO, M. A. *et al.* Aspectos epidemiológicos, clínicos e parasitológicos da doença de Chagas em Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 473-478, 2005.

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

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

QIAGEN. **QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook**. Hilden, 2012.

RAMASAWMY, R. *et al.* The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 43, p. 305–311, 2006.

RASSI Jr, A. *et al.* Chagas disease. **Lancet**, London, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

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

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

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

RODRÍGUEZ-PÉREZ, J. M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 97-102, 2005.

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

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

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

SHASTRY, B. S. SNP alleles in human disease and evolution. **Journal of Human Genetics**, Tokyo, v. 47, p. 561–566, 2002.

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

SOBRINO, B. *et al.* SNPs in forensic genetics: a review on SNP genotyping methodologies. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 154, p. 181–194, 2005.

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

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

TAVARES, N. A. C. **Polimorfismos nos genes da imunidade inata *IL18*, *PTPN22*, *CTLA4* e *TNF-α* associados ao diabetes mellitus do tipo 1**. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – RENORBIO, Recife, 2012

TORRES, O. A. *et al.* Association of the macrophage migration inhibitory factor -173G/C polymorphism with Chagas disease. **Human Immunology**, New York, v. 70, p. 543–546, 2009.

TURNER D. M. *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**, Oxford, v. 24, p. 1-8, 1997.

VALLE NETO, L. M. **Associação dos polimorfismos da região promotora de genes de citocinas pró e anti inflamatórias em pacientes com hipertensão arterial pulmonar esquistossomótica**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2013.

VASCONCELOS, R. H. T. *et al.* Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. **Human Immunology**, New York, v. 71, p. 964-967, 2010.

VASCONCELOS, R. H. T. *et al.* Immunoglobulin M antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. **Human Immunology**, New York, v. 72, p. 402-405, 2011.

VASCONCELOS, R.H.T. *et al.* Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: An overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. **Cytokine**, San Diego, v. 59, p. 203-208, 2012.

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

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

WANG, H. *et al.* Tumor necrosis factor. In: THOMSON, A. W.; LOTZE, M. T. **The Cytokine Handbook**. 4th ed. London: Academic Press, 2003. p. 837-860.

WILHELM, J. *et al.* Real-time polymerase chain reaction. **European Journal of Chemical Biology**, Weinheim, v. 4, n. 11, p. 1120-1128, 2003.

WILLIAMS-BLANGERO, S. *et al.* Genetic epidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas' disease. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 8, p. 337-345, 2003.

WILSON A. G. *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 3195-3199, 1997.

APÊNDICE A – Artigo Publicado

Cytokine 59 (2012) 203–208



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/issn/10434666

Review Article

Genetic susceptibility to chronic Chagas disease: An overview of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes

Romero H.T. Vasconcelos^a, Silvia M.L. Montenegro^a, Elisa A.N. Azevedo^a, Yara M. Gomes^{a,b}, Clarice N.L. Morais^{a,*}^a Department of Immunology, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Brazil^b Integrated Program on Chagas Disease, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 February 2012

Received in revised form 11 April 2012

Accepted 23 April 2012

Available online 15 May 2012

Keywords:

Chagas disease

Cytokines

Single nucleotide polymorphisms

ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic infection that is a significant public health problem in Latin America. The mechanisms responsible for susceptibility to the infection and the mechanisms involved in the development of cardiac and digestive forms of chronic Chagas disease remain poorly understood. However, there is growing evidence that differences in susceptibility in endemic areas may be attributable to host genetic factors. The aim of this overview was to analyze the genetic susceptibility to human Chagas disease, particularly that of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes. A review of the literature was conducted on the following databases: PubMed/MEDLINE and Scopus. The search strategy included using the following terms: "Cytokines", "Single Nucleotide Polymorphisms" and "Chagas Disease". After screening 25 citations from the databases, 19 studies were selected for the overview. A critical analysis of the data presented in the articles suggests that genetic susceptibility to Chagas disease and chronic Chagas cardiomyopathy is highly influenced by the complexity of the immune response of the host. Follow-up studies based on other populations where Chagas disease is endemic (with distinct ethnic and genetic backgrounds) need to be conducted. These should use a large sample population so as to establish what cytokine genes are involved in susceptibility to and/or progression of the disease.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease is a parasitic infection, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which remains a significant public health problem in Central and South America. It is estimated that 15 million people are currently affected and that Chagas disease results in 12,500 deaths annually, in Latin America [1].

The clinical manifestations of Chagas disease are characterized by a short acute phase, usually asymptomatic, followed by a long chronic phase, during which 70% of the individuals infected by *T. cruzi* remain asymptomatic, whereas the remaining 30% present severe forms with cardiac or digestive alterations. Both the mechanisms responsible for susceptibility to the infection and those involved in the development of cardiac and digestive forms of chronic Chagas disease remain poorly understood [2].

It has been suggested that human host genetic factors, environmental factors and variability among *T. cruzi* isolates are major determinants of the prevalence of Chagas disease and its clinical

manifestations in humans. Although these factors are probably responsible for the heterogeneity of Chagas disease, there is growing evidence that differential susceptibility in endemic areas may be attributable to host genetic factors [3]. The facts that only part of the population living in endemic areas becomes infected and that only one-third of those chronically infected develop symptoms, support the importance given by research to host genetic factors in susceptibility to and the development of chronic Chagas disease [4].

Different studies have reported several markers of genetic susceptibility to chronic Chagas disease. Some studies have addressed the relationship between genes within the major histocompatibility complex and Chagas disease [5–8], while others have also implicated some cytokine and chemokine genes as determining increased susceptibility to and further development of the cardiac form [9–14]. However, genetic susceptibility to *T. cruzi* infection and the development of cardiac or digestive forms are complex and heterogeneous and it is likely that they involve several genes, each of which make a modest contribution to the pathogenesis of the disease [3–12].

The genetic markers most used in association studies are single nucleotide polymorphisms (SNPs). Natural selection has favored introducing bi-allelic SNPs into cytokine genes which results in varying the production and level of protein rather than its quality

* Corresponding author. Address: Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz, Av., Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco CEP: 50670-420, Brazil. Tel.: +55 81 2101 2561; fax: +55 81 3453 1911.

E-mail address: clarice@cpqam.fiocruz.br (C.N.L. Morais).

[15]. Therefore, a review of the literature was carried out with the aim of clarifying certain questions, which to date have remained unclear, about genetic susceptibility to chronic Chagas disease, particularly with respect to the SNPs of cytokine genes.

2. Methods

2.1. Strategy for screening and selecting studies

The present overview selected studies carried out on humans that were found in the databases of PubMed/MEDLINE and Scopus. There was no restriction regarding language or publication date. The research period covered was until January 2012. No unpublished studies, revision articles, abstracts of scientific events, dissertations and theses were included. The following key-words were selected according to MeSH (Medical Subjects Heading Terms/PubMed): "Cytokine", "Single nucleotide polymorphisms" and "Chagas disease". The eligible studies were those in which the analysis included: the genotype or allelic frequencies of SNPs of cytokine genes that are probably related either to susceptibility to Chagas disease and/or to developing cardiac and digestive forms of chronic Chagas disease. The studies selected are presented in Table 1, in chronological order of publication and the key finding of each is shown.

3. Results

Screening the PubMed/MEDLINE and Scopus databases identified 25 non-duplicated articles. Of these, 5 studies were excluded after evaluating the title and the abstract, because they did not comply with the inclusion criterion that required the article to be original. Of the 20 articles selected for detailed analysis, one was excluded because it did not deal with SNPs of cytokine genes. Of the 19 eligible articles, 11 dealt with Chagasic patients, each of which had a control group of healthy individuals; and eight dealt only with Chagasic patients, who presented different clinical manifestations of the chronic phase. Table 1 shows the main characteristics of the studies selected, the populations under study, the target genes, the number of individuals and the main finding for each. All studies were published in English and were conducted on Latin American populations.

4. Discussion

The importance of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the pathogenesis of Chagas disease made this cytokine one of the first to be studied and it remains the most studied one with regard to SNPs and susceptibility to the disease. Some studies have sug-

Table 1
Single nucleotide polymorphisms of cytokine genes and Chagas disease.

Year	Main author	Study population	Number of individuals	Target genes	Main findings
1998	Beraún et al. [20]	Peruvian	85 Chagasic patients and 87 healthy controls subjects	TNF- α (-308G/A; -28G/A)	No association
2005	Rodríguez-Pérez et al. [13]	Mexican	54 Chagasic patients and 169 healthy controls subjects	TNF- α (-308G/A; -238G/A)	Cardiomyopathy (-308G/A)
2006	Drigo et al. [21]	Brazilian	42 Chagasic patients	TNF- α (-308G/A)	Death (cardiac patients)
2006	Flórez et al. [35]	Colombian	260 Chagasic patients	IL-1 α (-889C/T; +4845G/T), IL-1 β (-511C/T; -31T/C; +3954T/C; +5810G/A) and IL-1RN (+8006T/C; +8061C/T; +1100T/C)	Cardiomyopathy IL-1 β (+5810G/A)
2006	Ramasawmy et al. [25]	Brazilian	230 Chagasic patients	BAT1 (-348C/T; -22C/G)	Cardiomyopathy
2006	Ramasawmy et al. [12]	Brazilian	245 Chagasic patients	MCP1 (-2518A/G)	Cardiomyopathy
2007	Drigo et al. [22]	Brazilian	246 Chagasic patients	TNF- α (-308G/A)	No association
2007	Ramasawmy et al. [27]	Brazilian	245 Chagasic patients	IT- α (+80A/C; +252A/G)	Cardiomyopathy
2007	Zafra et al. [44]	Colombian	260 Chagasic patients and 200 healthy controls subjects	IL-12 β (+1188A/C)	Cardiomyopathy
2009	Calzada et al. [10]	Peruvian and Colombian	347 Chagasic patients and 279 healthy controls subjects	TGF- β 1 (-988C/A; -800G/A; -509C/T; +10T/C; +263C/T)	Susceptibility (+10T/C)
2009	Costa et al. [11]	Brazilian	155 Chagasic patients and 43 healthy controls subjects	IL-10 (-1082G/A)	Cardiomyopathy
2009	Cruz-Robles et al. [36]	Mexican	86 Chagasic patients, 109 healthy controls subjects and 50 idiopathic dilated cardiomyopathy patients	IL-1 β (-511C/T) and IL-1RN (+8006T/C; +8061C/T; +1100T/C)	Susceptibility and cardiomyopathy IL-1RN (+1100T/C)
2009	Torres et al. [14]	Peruvian and Colombian	314 Chagasic patients and 284 healthy controls subjects	MIP (-173G/C)	Susceptibility
2010	Torres et al. [39]	Peruvian and Colombian	317 Chagasic patients and 399 healthy controls subjects	IL-6 (-174G/C)	No association
2010	Torres et al. [41]	Colombian	236 Chagasic patients and 282 healthy controls subjects	INF- γ (+874T/A)	Susceptibility
2011	Amez et al. [55]	Bolivian	74 Chagasic patients and 36 healthy controls subjects	IL-4 (-509C/T)	Susceptibility
2011	Pisetti et al. [23]	Brazilian	168 Chagasic patients and 132 healthy controls subjects	TNF- α (-308G/A; -238G/A)	Susceptibility (-238G/A)
2011	Flórez et al. [52]	Colombian	260 Chagasic patients	IL-4 (-509C/T) and IL-10 (-1082G/A; -819C/T; -592C/A)	No association
2012	Criado et al. [24]	Colombian	313 Chagasic patients	TNF- α (-1031T/C; -308G/A)	Cardiomyopathy

gested that a high TNF- α production in the target organs of Chagas disease is partially responsible for the severity of the pathology. The high frequency of TNF- α producing lymphocytes and increased plasma levels have also been reported in chronic Chagasic patients, there being a high correlation with the degree of heart dysfunction [16–18].

The TNF- α gene contains many SNPs, of which the two that are the most studied are as follows: the first is located at position –238 and the second at –308, both in relation to the transcription start site, in which the presence of guanine (G) defines the wild type allele (i.e. the most common allele). It has been demonstrated for both positions that the presence of adenine (A) results in greater gene transcription with functional implications [19].

The study conducted on Peruvian Chagasic patients by Beraún et al. [20] evaluated both of these SNPs, but found no association with susceptibility to nor with the cardiac form of chronic Chagas disease. In this study, the –308A allele frequency was higher among chronic cardiac patients than asymptomatic patients, although this difference was not regarded as statistically significant. The lack of association between –238 SNP of TNF- α gene and Chagas disease found by Beraún et al. [20] was corroborated years later by Rodríguez-Pérez et al. [13] with regard to a Mexican population. However, these authors also evaluated the –308 SNP of TNF- α gene and concluded that this position could be a marker involved with chronic Chagas disease. The group of chronic Chagasic patients studied showed the frequency of the –308A allele increased when compared to the healthy control subjects. Statistical analysis also showed increased frequency of this allele in cardiac patients when compared with asymptomatic patients. The importance of the presence of the –308A allele in chronic cardiac Chagasic patients was shown in a survival study on a Brazilian population, conducted by Drigo et al. [21], in which the authors concluded that this allele is associated with a higher risk of progression to death than the other allele. The same group of researchers also evaluated the role of the –308 SNP of TNF- α gene in relation to susceptibility to chronic cardiac Chagas disease and found no statistically significant differences in allele frequency between cardiac and asymptomatic patients [22]. The authors suggested that the conflicting results may be due to differing genetic backgrounds, especially in the Brazilian population. In other words, Drigo et al. [22] consider that it is possible that the genetic background of the Brazilians was more varied than that of the Mexicans.

More recently, Pissetti et al. [23] studied both –238 and –308 TNF- α SNPs in a group of 300 individuals living in an area of Brazil where Chagas disease is endemic and found different results for each position. In relation to the –238 SNP, they concluded after analyzing their results that the allele A was more frequent among seropositive individuals. However, no association was observed when the patients were divided into cardiac and indeterminate clinical forms. In relation to the –308 SNP, no significant association was established. A different conclusion was reached by Criado et al. [24] who analyzed the TNF- α gene in the –308G/A position and also in the –1031T/C position in a Colombian endemic population. The allele C of the –1031 position has been associated with increased TNF- α gene expression and protein production [19]. Criado et al. [24] found a significant difference in the distribution of these alleles between cardiomyopathic and asymptomatic patients, which suggests that both alleles (–1031C and –308A) may have an influence on Colombians with chronic Chagas Disease being susceptible to developing Chagasic cardiomyopathy [24]. Differences in the ethnic and genetic structure of the populations studied might be the reason for the different profile of susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy observed in relation to the TNF- α gene [23].

In a further study of the region of the TNF- α gene, Ramasawmy et al. [25] analyzed SNPs of the BAT1 (HLA-B associated transcript

1) gene, located approximately 40 kb of the TNF- α gene in a Brazilian group of Chagasic patients. BAT1 has been shown to down-regulate the production of the inflammatory cytokines, TNF- α and interleukin-6 (IL-6), in *in vitro* studies, and thus it is likely to have an anti-inflammatory action [26]. The authors analyzed two SNPs in the promoter region of this gene (–22C/G and –348C/T), which affect transcriptional activity. The major finding is an association between the allele C for both promoter SNPs and the risk of developing cardiomyopathy. As these alleles lead to decreased expression of the BAT1 gene, individuals who are carriers of them probably present a more intense inflammatory response and might present greater heart damage [25].

Variants in the lymphotoxin-alpha (LT- α) gene, located just 1,200pb of the TNF- α gene were also analyzed in these patients [27]. LT- α is an inflammatory molecule, a member of the TNF family of cytokines, and is synthesized mainly by activated T and B lymphocytes [28]. It has been suggested that the SNPs +80A/C and +252A/G in intron 1 of the LT- α gene are the main predictors of LT- α production [29]. Chagasic patients harboring the +80C and/or +252/G alleles were more susceptible to developing cardiomyopathy. These alleles are reported to correlate with high reporter-gene expression and LT- α production by peripheral blood mononuclear cells [27].

This group of researchers also evaluated the role of the monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1) SNP at the –2518 position [12]. Monocytes recovered from subjects, whose G allele is at position –2518 in the distal regulatory region of the MCP-1 gene, expressed more of this protein than did cells from –2518A homozygous individuals [30]. The survey analysis concluded that allele A seems to confer susceptibility to Chagas cardiomyopathy. The increased risk of developing the cardiac form given by the presence of the A allele may be explained by lower levels of MCP-1, which would lead to a delayed recruitment of macrophages to the site of infection, and this could impair the ability of the host to eliminate the parasite, resulting in the spread of *T. cruzi* by the affected organ [12]. These authors suggest that these genes (BAT1, LT- α and MCP-1) may be genetic factors involved in the pathogenesis of cardiac Chagas disease.

Several studies report that cytokines such as interleukin 1 (IL-1), IL-6 and interferon gamma (IFN- γ), besides TNF- α , modulate the expression of adhesion molecules that play a role in the inflammatory process of chronic Chagasic cardiomyopathy [31–33]. IL-1 is a primary inflammatory cytokine that has been implicated in mediating both the acute and the chronic pathological inflammatory process. The IL-1 cluster consists of three members. The first two, IL-1 α and IL-1 β , are pro-inflammatory cytokines that bind the IL-1 receptor, whereas the third is the receptor antagonist (IL-1RN). IL-1RN is a soluble inhibitor of these IL-1 agonists and acts by competitively binding to the cell surface receptor without triggering signal transduction [34].

Several SNPs within the IL-1 gene cluster have been described. Florez et al. [35] studied IL-1 α , IL-1 β and IL-1RN SNPs in a Colombian population and their possible association with the clinical forms of Chagas disease. In this study, examination of genetic markers in the IL-1 α (–889C/T and +4845G/T), IL-1 β (–511C/T, –31T/C, and +3954T/C) and IL-1RN (+8006T/C, +8061C/T, +11100T/C) genes revealed that the overall distribution of alleles and genotypes in patients with Chagasic cardiomyopathy and those who were asymptomatic were not significantly different. However, the G allele of the +5810G/A SNP of IL-1 β was associated with the risk of developing Chagasic cardiomyopathy. This SNP is located in intron 4, and the characteristics of its biological effects await elucidation. [35].

More recently, Cruz-Robles et al. [36] studied, in a Mexican population, the –511C/T, SNP in the IL-1 β promoter region, because this allele position has an influence on protein production, where the T allele carriers show increased levels of IL-1 [37]. However,

there were no significant differences in the allele and genotype distribution of this SNP among the group of all Chagasic patients and the control group. But, in the same study, on analyzing genotype frequencies of the +11100 IL-1RN SNP, a significant increase in the CC genotype was found in the group of infected individuals. Likewise, there was a significant increase in the frequency of this genotype in patients with chronic Chagas cardiomyopathy. In addition to the IL-1 β gene, the IL-1RN gene also has a role in the susceptibility to Chagas disease [36].

Some authors have recognized the importance of IL-6 in *T. cruzi* infection, because high IL-6 concentrations in serum and infected tissues have been associated with the evolution from the acute to the chronic phase of Chagas disease, which suggests an increase in cell injury that leads to the cardiac function deterioration [38]. Despite these findings, Torres et al. [39] did not observe any significant differences in the genotype distribution between Chagasic patients and healthy individuals in the control group in two independent cohorts from Colombia and Peru for the -174G/C promoter SNP of the IL-6 gene that has been shown to affect both the transcription and secretion of this cytokine.

After analyzing the same cohort from Colombia and Peru, these authors found an association with susceptibility to *T. cruzi* infection, and the migration inhibitory factor (MIF) [14]. MIF protein is a pleiotropic cytokine produced by activated T cells, macrophages, and the pituitary gland. It is considered an integral component of the host antimicrobial alarm system and response to stress that promotes the pro-inflammatory functions of immune cells [40]. In the -173G/C promoter SNP of the MIF gene, the -173C allele has been associated with a higher level of MIF protein. As to both the Colombian and Peruvian cohorts, the authors demonstrated that the presence of the -173C allele confers the risk of developing chronic Chagas disease. However, no statistically significant difference was observed when comparing asymptomatic and cardiac patients [14].

Another study by Torres et al. [41] was conducted to assess the potential association of the SNP located in the first intron of the human IFN- γ gene, located at +874T/A position, with susceptibility to and the clinical status of chronic Chagas disease in the Colombian population analyzed in other studies by this research group [14,39]. IFN- γ is a multifunctional cytokine, which is produced by effector T and natural killer cells, that controls the development of T helper 1 (Th1) cells. It is critical for host defense against a variety of intracellular pathogens, including *T. cruzi* infection [42]. Analysis of the biological role of this SNP suggested that +874A allele carriers are low IFN- γ producers [43]. The authors found a significant difference in the distribution of the +874A allele between patients and healthy control subjects. However when the frequencies of this allele between asymptomatic patients and those with Chagasic cardiomyopathy were compared, no significant difference was found. The authors suggest that the IFN- γ +874T/A SNP may be involved in susceptibility but not in the progression of Chagas disease in this Colombian population [41].

Moreover, Zafra et al. [44] evaluated a SNP in the interleukin-12 (IL-12) gene. This is an immunomodulatory cytokine that induces the production of IFN- γ , favors the differentiation of T helper 1 (Th1) cells and forms a link between innate and adaptive immunity [45]. These characteristics suggest that this cytokine plays an important role in normal host defense against infection by a variety of intracellular parasites, including *T. cruzi*. Biologically active IL-12 is a heterodimeric proinflammatory cytokine consisting of two chains (IL-12 α and IL-12 β) which are coded by separate genes on different chromosomes [45]. In the IL-12 β gene, the presence of the C allele in the position +1188A/C, has been correlated with increased *in vitro* IL-12 secretion and susceptibility to some infectious diseases [46]. In the Colombian population studied by Zafra et al. [44], no statistically significant differences were observed in

the genotypes and allele distribution between seropositive patients and control individuals of this SNP, which suggests that it has no influence on susceptibility to *T. cruzi* infection. Interestingly, they found that the CC genotype was significantly increased among cardiomyopathy patients when compared to asymptomatic individuals. In accordance with these results, the more abundant C allele in the cardiomyopathy group can be related to a tendency to produce high levels of IL-12 in response to stimulus by the parasite antigens favoring a Th1 response [44].

More recently, some authors have recognized the importance of the regulatory T cells in the pathogenesis of Chagas disease [47]. Prior to this, research showed that these cells are generally a population of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells that can suppress the immune response by producing anti-inflammatory cytokines, such as interleukin-10 (IL-10) and the transforming growth factor beta (TGF- β) [48]. In a systematic review study, Araújo et al. [49] concluded, after analyzing regulatory T cell in chronic Chagasic patients, that these cells increase in number in asymptomatic Chagasic patients when compared with those with cardiomyopathy. In accordance with these results, asymptomatic chronic Chagasic patients seem to produce and secrete higher levels of IL-10 and TGF- β , the cytokines produced by this cell type [48].

Accordingly, Calzada et al. [10] analyzed five SNPs in the TGF- β 1 gene with known or suggested functional significance (-988C/A, -800G/A, -509C/T, +10T/C and +263C/T) in two cohorts of individuals from Peru and Colombia. They only found a significant difference in the SNP in position +10T/C, between patients and healthy control subjects in both cohorts, when analyzed both independently and together. It was previously shown that the T allele is associated with a lower, and the C allele with a higher, TGF- β protein production [50]. The frequency of the high TGF- β 1 producer genotype +10C/C was increased in the patients groups of both populations. However no statistical difference was found when genetic variants of the TGF- β 1 gene were compared among asymptomatic and cardiac individuals in any of the two populations studied [10]. The authors suggested that the association between +10T/C TGF- β 1 and susceptibility to Chagas disease could be ascribed to different systemic or local TGF- β levels as well as to its biological functions during *T. cruzi* infection.

In addition, Costa et al. [11] analyzed a SNP in the promoter region of the IL-10 gene in a Brazilian population. The IL-10 gene promoter region is highly polymorphic and a correlation between the allele A of the -1082G/A position with low IL-10 production has been previously described [51]. The comparison between uninfected individuals and Chagasic patients with respect to the genotype and allele frequency for the -1082G/A SNP did not show any differences. However, this SNP follows a non-random distribution pattern among patients with Chagas disease. A difference was found between the cardiac and asymptomatic patients with respect to the occurrence of the A allele, the low producer of IL-10 [11]. The authors related an association between the A allele and the cardiac form of Chagas disease. They also analyzed the cardiac patients divided by the degree of cardiac damage in non-dilated and dilated cardiac patients and found different allele and genotype frequencies among them. On the basis of this evidence, they suggest that the pathogenesis of the non-dilated and dilated cardiac forms may involve distinct mechanisms [11]. Flórez et al. [52] in a recent study conducted on a Colombian population analyzed not only the -1082G/A SNP, but also the -819C/T and -592C/A positions in the IL-10 gene and observed no statistical significant differences in the genotype and allele frequency of these SNPs between cardiomyopathic and asymptomatic patients. However these authors did not divide the cardiomyopathic patients according to cardiac damage like Costa et al. [11]. These findings suggest that the human genetic background in IL-10 gene may be a critical factor that could influence

susceptibility to and the outcome of cardiomyopathy in Chagas disease.

In the same study, Flórez et al. [52] also analyzed the –509C/T promoter SNP of the interleukin-4 (IL-4) gene in Colombian Chagasic patients. In Chagas disease, this cytokine seems to maintain inflammation and the persistence of parasites in chronic patients [53]. The –509T allele is associated with an increased expression of IL-4 *in vitro* [54]. Although the analysis was conducted on a large number of Chagasic individuals, no statistical difference was observed in the genotype and allele frequency of this SNP among cardiac and asymptomatic patients. Amez et al. [55] also evaluated the –590C/T SNP in a Bolivian population. The authors found an increased frequency of the allele T in healthy control subjects, which suggests that this allele is a genetic marker that confers protection against *T. cruzi* infection, although the analysis was conducted on a small sample and therefore further studies are needed to confirm this hypothesis [55].

A critical analysis of the data presented in this overview suggests that the genetic susceptibility to Chagas disease and chronic Chagas cardiomyopathy is highly influenced by the complexity of the immune response of the host. In approximately 14 years of research into the SNPs of cytokine genes in Chagas disease, many loci have been studied and some of them showed a possible association with susceptibility to and/or progression of the disease. It is worth noting that none of the studies were conducted on chronic digestive Chagasic patients. Therefore no contribution was added to the knowledge of the genetic factors of the host that contribute to this chronic clinical form of Chagas disease being developed.

Most studies were conducted on Brazilians, Peruvians and Colombians, who are populations with distinct ethnic and genetic backgrounds. Identifying the genetic markers that establish the disease and its progression will probably meet with better success if other populations in which Chagas disease is endemic were to be studied more, such as those of Mexico, Bolivia, Chile and Argentina, and if a large sample size were to be used in such studies.

After establishing the genotypes and alleles of cytokines that are involved in susceptibility to and/or progression of the disease with case-control studies, it is important to conduct studies in future like that of Drigo et al. [21]. The follow-up of asymptomatic patients who are carriers of alleles and probably to relate this to developing chronic Chagas cardiomyopathy may confirm the viability of using each gene as a valuable genetic marker in the prognosis of Chagas disease. The prognosis for increased mortality of patients who are carriers of some alleles may also be appropriate to establishing new treatments for this chronic disease for which to date an effective therapy has not been designed. The administration or the blockage of some cytokines could be used as new supportive therapies that could improve the quality of life of chronic Chagasic patients and decrease mortality from the disease in the not too distant future.

Grant sponsor

The authors are grateful to the following Brazilian research bodies for the award of grants that made this study possible: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Acknowledgments

S.M.L. Montenegro and Y.M. Gomes are fellows of CNPq, nº 306427/2006-0 and nº 307664/2006-6, respectively. R.H.T.

Vasconcelos received a CNPq PhD scholarship (nº 151205/2010-8) and E.A.N. Azevedo received a scholarship from PIBIC/Fiocruz.

References

- [1] Dias JCP, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41:193–6.
- [2] Dutra WO, Rocha MOC, Teixeira MM. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol* 2005;21:581–7.
- [3] Williams-Blangero S, Vandenberg JL, Blangero J, Corrêa-Oliveira R. Genetic epidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas' disease. *Front Biosci* 2003;8:337–45.
- [4] Cruz-Robles D, Reyes PA, Monteón-Padilla VM, Ortiz-Muñiz AR, Vargas-Alarcón G. MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease. *Hum Immunol* 2004;65:50–5.
- [5] Deghade NHS, Dantes RO, Doradi EA. HLA class I and class II profiles of patients presenting with Chagas Disease. *Dig Dis Sci* 1998;43:246–52.
- [6] Iayrisse Z, Fernandez MT, Montagnani S, Matos M, Balbas O, Herrera F, et al. HLA-C*03 is a risk factor for cardiomyopathy in Chagas disease. *Hum Immunol* 2000;61:925–9.
- [7] Iop E, Rothhammer F, Acuña M, Apt W. HLA antigens in cardiomyopathic Chilean Chagasics. *Am J Hum Genet* 1988;43:770–3.
- [8] Nieto A, Beraún Y, Collado MD, Caballero A, Alonso A, González A, et al. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens* 2000;55:195–8.
- [9] Calzada JE, Nieto A, Beraún Y, Martín J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 2001;58:154–8.
- [10] Calzada JE, Beraún Y, González CI, Martín J. Transforming growth factor beta1 (TGβ1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. *Cytokine* 2009;45:149–53.
- [11] Costa GC, Rocha MOC, Moreira PR, Menezes CAS, Silva MR, Gollob KJ, et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2009;199:451–4.
- [12] Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Faé KC, Martello FG, Müller NG, Cavalcanti VI, et al. The monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human Chagas disease. *Clin Infect Dis* 2006;43:305–11.
- [13] Rodríguez-Pérez JM, Cruz-Robles D, Hernández-Pacheco G, Pérez-Hernández N, Murguía LE, Granados J, et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett* 2005;98:97–102.
- [14] Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González CI, González A, et al. Association of the macrophage migration inhibitory factor –173G/C polymorphism with Chagas disease. *Hum Immunol* 2009;70:543–6.
- [15] Ollier WER. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine* 2004;28:174–8.
- [16] Lorena VMB, Lorena LMB, Braz SCM, Melo AS, Melo MIPAD, Melo MGAC, et al. Cytokine levels in serious cardiomyopathy of Chagas disease after *in vitro* stimulation with recombinant antigens from *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol* 2010;72:529–39.
- [17] Ferreira RC, Ianni BM, Abel IC, Buck P, Mady C, Kalil J, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/indeterminate and Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:407–11.
- [18] Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomez YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in Chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 2004;38:943–50.
- [19] Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HA, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3195–9.
- [20] Beraún Y, Nieto A, Collado MD, González A, Martín J. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. *Tissue Antigens* 1998;52:81–3.
- [21] Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Cardoso MRA, Braga PE, Faé KC, et al. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Microbes Infect* 2006;8:598–603.
- [22] Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Mady C, Faé KC, Buck P, et al. Lack of association of tumor necrosis factor-α polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. *Immunol Lett* 2007;108:109–11.
- [23] Pisseff CW, Correia D, Oliveira RP, Llaguno MM, Balarin MAS, Silva-Grecco RS, et al. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e976.
- [24] Criado L, Flórez O, Martín J, González CI. Genetic polymorphisms in *TNFA/TNFR2* genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine* 2012;57:398–401.
- [25] Ramasawmy R, Cunha-Neto E, Faé KC, Müller NG, Cavalcanti VI, Drigo SA, et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2006;193:1394–9.
- [26] Alkock RJ, Williams JH, Price P. The central MHC gene, BAT1, may encode a protein that down-regulates cytokine production. *Genes Cells* 2001;6:487–94.
- [27] Ramasawmy R, Faé KC, Cunha-Neto E, Müller NG, Cavalcanti VI, Ferreira RC, et al. Polymorphisms in the gene for lymphotxin-predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2007;196:1836–43.

- [28] Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, Sekine A, Yamada R, Tsunoda T, et al. Functional SNPs in the lymphotxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 2002;32:650–4.
- [29] Knight JC, Keating BJ, Kwiatkowski DP. Allele-specific repression of lymphotxin alpha by activated B cell factor-1. *Nat Genet* 2004;36:394–9.
- [30] Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:344–8.
- [31] Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, et al. WSK-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 2003;19:657–67.
- [32] Michailowsky V, Celes MR, Marino AP, Silva AA, Vieira IQ, Rossi MA, et al. Intercellular adhesion molecule 1 deficiency leads to impaired recruitment of T lymphocytes and enhanced host susceptibility to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 2004;173:463–70.
- [33] Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA, Chandra M, Loredó ML, Weiss LM, et al. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic Chagasic heart disease. *Infect Immun* 2005;73:2496–503.
- [34] Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist: a new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 1991;88:1445–51.
- [35] Flórez O, Zafra G, Morillo C, Martín J, González CI. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in Chagas disease in a Colombian case-control study. *Hum Immunol* 2006;67:741–8.
- [36] Cruz-Robles D, Chávez-González JP, Cavazos-Quero MM, Pérez-Méndez O, Reyes PA, Vargas-Alarcón G. Association between IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility. *Immunol Invest* 2009;38:231–9.
- [37] Slowik A, Boratynska A, Turaj W, Pera J, Dziędzic T, Wloch D, et al. Interleukin 1β -511 C/T polymorphism and risk of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:279–80.
- [38] López L, Arai K, Giménez E, Jiménez M, Pascuzzo C, Rodríguez-Bonfante C, et al. C reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure. *Rev Esp Cardiol* 2006;59:50–6.
- [39] Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González A, González CI, et al. Lack of association between IL-6 -174G/C gene polymorphism and Chagas disease. *Tissue Antigens* 2010;76:131–4.
- [40] Baugh JA, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J Endocrinol* 2003;179:15–23.
- [41] Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González A, González CI, et al. Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect Genet Evol* 2010;10:682–5.
- [42] Silva JS, Morrissey PJ, Grahstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1992;175:169–74.
- [43] Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 1991;146:3626–32.
- [44] Zafra G, Morillo C, Martín J, González A, González CI. Polymorphism in the 3' UTR of the IL12B gene is associated with Chagas' disease cardiomyopathy. *Microbes Infect* 2007;9:1049–52.
- [45] Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:361–8.
- [46] Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003;19:641–4.
- [47] Araújo FF, Silveira AB, Correa-Oliveira R, Chaves AT, Adad SJ, Fuiza JA, et al. Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Hum Pathol* 2011;42:299–301.
- [48] Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, Lage PS, et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3, CD16, CD56, natural killer T cells and CD4, CD25 high regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2005;62:297–308.
- [49] Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, Sathler-Avelar R, et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *Plos Negl Trop Dis* 2011;5:e992.
- [50] Yamada Y, Fujisawa M, Ando F, Niino N, Tanaka M, Shimokata H. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with blood pressure in Japanese individuals. *J Hum Genet* 2002;47:243–8.
- [51] Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the IL-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1–8.
- [52] Flórez O, Martín J, González CI. Interleukin 4, interleukin 4 receptor-α and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. *Parasite Immunol* 2011;33:506–11.
- [53] Ribeiro BM, Crema E, Rodrigues VJ. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. *Hum Immunol* 2008;69:484–9.
- [54] Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D, Hofer C, Weiland SK, Fritzsche C, et al. A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:893–8.
- [55] Arnez LEA, Venegas EN, Ober C, Thompson EE. Sequence variation in the IL4 gene and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivians. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:279–82.

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Paciente Chagásico



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTE CHAGÁSICO

Projeto: CORRELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA.

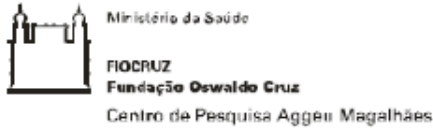
Eu, _____,
RG _____, residente na _____,
bairro _____, município _____, estado _____, usuário do
telefone (____) _____, abaixo assinado, atesto que aceito participar desse estudo cujo
objetivo é analisar genes (DNA) que fazem parte do sistema imune (sistema de defesa do
organismo) e estariam influenciando o nível sanguíneo de citocinas (substâncias liberadas na
corrente sanguínea pelas células do sistema imune). O estudo irá analisar se estes genes podem
estar influenciando no desenvolvimento de uma determinada forma clínica crônica da Doença
de Chagas. Fui informado que como indivíduo selecionado para o estudo terei 1 colher de sopa
(15 ml) de meu sangue coletado através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e
descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é
descartável, porém, poderá causar dor ou hematoma. Também fui informado que meu sangue
será separado e que o soro (parte líquida) e o DNA das células do sistema imune serão
guardados a -20°C para depois serem analisados, durante a execução deste estudo. Fui
informado ainda que, se os genes que influenciam na quantidade destas substâncias produzidas
pelo sistema imune funcionarem para diferenciar as formas clínicas crônicas da Doença de
Chagas, serão de grande auxílio para direcionar a conduta dos médicos em relação ao
tratamento de pacientes chagásicos no futuro. Fui informado que os meus dados serão
preservados em sigilo absoluto quando da publicação do resultado da pesquisa. Também fui
informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de
penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo.
Fui informado também que esse termo deve ser assinado em duas vias, ficando uma em posse
do pesquisador responsável e outra comigo. Atesto que entendi o conteúdo deste termo de
consentimento, concordo de livre e espontânea vontade em participar desse estudo e que
esclareci todas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável pelo projeto.

Recife, ____ de _____ de 20__

Assinatura do Participante

Assinatura do pesquisador responsável pelo projeto
Romero Henrique Teixeira Vasconcelos
Doutorando em Saúde Pública do CPqAM/Fiocruz
Telefone para contato: 2101-2561

APÊNDICE C – Formulário de Pesquisa



FORMULÁRIO DE PESQUISA

1. Nome: _____
 Prontuário HUOC: _____ Registro CPqAM: _____ Data da coleta: ____/____/____
2. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino
3. Idade: _____
 (1) De 18 a 39 anos (2) De 40 a 59 anos (3) A partir de 60 anos (4) Ignorada
4. Situação trabalhista:
 (1) Empregado (2) Desempregado (3) Aposentado (4) Do lar (5) Ignorada
5. Endereço: _____
 Bairro: _____ Município: _____ Estado: _____
6. Município de nascimento: _____ Estado: _____
7. Forma provável de contaminação:
 (1) Vetorial (2) Transfusional/ Transplante de órgão (3) Congênita
 (4) Oral (5) Acidente de laboratório (6) Ignorada
8. Exames clínicos convencionais:
 RX coração (1) normal (2) dilatação (3) ignorado
 ECG (1) normal (2) alterado (3) ignorado
 RX esôfago (1) normal (2) dilatação (3) ignorado
 Enema opaco (1) normal (2) dilatação (3) ignorado
9. Sorologia:
 IFI (1) positivo (2) negativo (3) ignorada
 HAI (1) positivo (2) negativo (3) ignorada
 ELISA (1) positivo (2) negativo (3) ignorada
10. Forma clínica crônica:
 (1) Cardíaca (2) Digestiva (3) Indeterminada (4) Mista
11. Medicação (tratamento etiológico):
 (1) Sim – ano de tratamento: _____ (2) Não
12. Outras patologias/agrivos/hábitos:
 (1) DIP: _____ (2) Neoplasia: _____ (3) Tabagismo
 (4) Diabetes: _____ (5) Hipertensão: _____ (6) Alcoolismo
 (7) Hipercolesterolemia: _____ (8) Sedentarismo

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



Título do Projeto: Correlação entre polimorfismo genético e níveis séricos de citocinas na doença de Chagas crônica.

Pesquisador responsável: Romero Henrique Teixeira Vasconcelos

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 10/03/10

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 02/10

Registro no CAAE: 0001.0.095.000-10

PARECER Nº 07/2010

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

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 18 de março de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 18 de março de 2010.

Giselle Campozana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0463376
CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 08/10/2010.