



Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Departamento de Saúde Coletiva



Mestrado em Saúde Pública

**Caracterização do Perfil Isotípico das
Imunoglobulinas G de Indivíduos
Chagásicos Frente aos Antígenos
Recombinantes CRA e FRA de
*Trypanosoma cruzi***

Alinne Fernanda Amaral Verçosa

Recife, 2006

ALINNE FERNANDA AMARAL VERÇOSA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ISOTÍPICO DAS IMUNOGLOBULINAS G DE
INDIVÍDUOS CHAGÁSICOS FRENTE AOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E
FRA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Dissertação apresentada ao
Departamento de Saúde Coletiva do
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
da Fundação Oswaldo Cruz para a
obtenção do título de Mestre em Saúde
Pública.

Orientadora: Yara de Miranda Gomes, PhD.
Co-orientador: Wayner Vieira de Souza, PhD.

Recife, 2006

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- V481c Verçosa, Alinne Fernanda Amaral.
Caracterização do Perfil Isotípico das
Imunoglobulinas G de Indivíduos Chagásicos Frente aos
Antígenos Recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma
cruzi* / Alinne Fernanda Amaral Verçosa. — Recife: A.
F. A. de Verçosa, 2006.
103 p. : il.
- Dissertação (mestrado em saúde pública) — Centro
de Pesquisas Aggeu, Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, 17 fev. 2006.
Orientadora: Yara de Miranda Gomes
Co-orientador: Wayner Vieira de Souza.
1. Doença de Chagas - imunologia. 2.
Imunoglobulina G. 3. Isotipos da Imunoglobulina. 4.
Marcadores biológicos. 5. Proteínas recombinantes. I.
Gomes, Yara de Miranda. II. Souza, Wayner Vieira de.
III. Título.

CDU 616.937

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DEPARTAMENTO DE SAÚDE COLETIVA

Esta dissertação intitulada:

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ISOTÍPICO DAS IMUNOGLOBULINAS G DE
INDIVÍDUOS CHAGÁSICOS FRENTE AOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E
FRA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

apresentada por

ALINNE FERNANDA AMARAL VERÇOSA

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Titulares: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira
 Dr. Eduardo José Moura do Nascimento

Suplentes: Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
 Dr. Rafael Dhália

Dissertação defendida e aprovada em 17 de fevereiro de 2006.

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, Fernando e Mônica, que
sempre me incentivaram e apoiaram a fazer
tudo aquilo que desejei.
Um grande beijo.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Yara Gomes, por ter me orientado desde a iniciação científica até o mestrado, me dando a oportunidade de crescer cientificamente, e por acreditar no meu trabalho.

Ao Dr. Wayner Souza, pela co-orientação.

A todos que compõem o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, por fazer deste Centro de pesquisas um local de formação de recursos humanos muito importante no nosso país.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo financiamento da bolsa a mim creditada durante todo o mestrado.

À Biomanguinhos/Fiocruz, pelo apoio financeiro deste trabalho, além do fornecimento das proteínas utilizadas no estudo.

À coordenação da pós-graduação e à secretaria acadêmica, pelo apoio constante.

Aos bibliotecários do CPqAM/Fiocruz, pelos artigos científicos fornecidos.

Ao Laboratório de Métodos Quantitativos do CPqAM/Fiocruz, pela contribuição nas análises estatísticas realizadas neste trabalho.

Ao Setor de Transporte do CPqAM/Fiocruz, por disponibilizar a viatura ao Ambulatório de Doença de Chagas do HUOC.

Aos Ambulatórios de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas-UFPE e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz-UPE, pela permissão para seleção de pacientes chagásicos cadastrados.

Aos meus amigos, integrantes do departamento de Imunologia ou não, que torceram por e acreditaram em mim.

Aos pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis que aceitaram participar deste estudo e contribuir para o progresso da ciência, conscientes de que podem até

não estar sendo beneficiados diretamente, mas que o benefício de sua colaboração será proporcionado a todos os chagásicos.

Agora, o meu maior agradecimento vai para uma pessoa que, sem ela, talvez hoje eu não estivesse concluindo esta importante etapa de minha vida: Virginia Lorena. Sempre com uma palavra de incentivo e confiança, me ajudou a permanecer na vida científica. Além disso, foi um exemplo para mim de responsabilidade e critério na pesquisa científica. Hoje eu a considero como amiga e irmã. Vi, sei que posso contar com você pra tudo. E você pode considerar o mesmo. Um grande beijo.

RESUMO

Em virtude da magnitude da infecção, onde cerca de 18 milhões de pessoas estão infectadas na América Latina, de sua elevada morbimortalidade, com destaque para a cardiopatia, além da quase ineficácia do tratamento etiológico, justificam-se estudos que visem à melhoria da qualidade de vida dos portadores da enfermidade de Chagas. Sabe-se que a resposta de isotipos específicos tem sido associada às manifestações clínicas da doença de Chagas. Assim, nos propomos a pesquisar as subclasses de IgG no soro de indivíduos chagásicos frente a dois antígenos específicos do *Trypanosoma cruzi*, visando a obtenção de um perfil isotípico que seja capaz de discriminar as formas clínicas cardíaca (CARD), mista (MIS) e indeterminada (IND). Para isso, coletamos sangue para obtenção de soro de 60 pacientes chagásicos (CARD= 33, MIS= 7 e IND= 20), selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, ambos situados na cidade de Recife-PE. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente para caracterização das formas clínicas e realizaram exames confirmatórios para infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, também coletamos sangue de 40 indivíduos sadios (indivíduos não-chagásicos= 20 e controles negativos para o *cut-off*= 20) que apresentaram sorologia negativa para infecção pelo *T. cruzi*. Todos os indivíduos tiveram participação voluntária e os procedimentos adotados no trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Os antígenos recombinantes (Ags-Recs) *Cytoplasmic Repetitive Antigen* (CRA) e *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA) foram analisados através de SDS-PAGE, seguido por colorações pela prata e pelo ácido periódico de Schiff, ficando comprovada a integridade dos Ags-Recs e ausência de

contaminações bacterianas. As concentrações ideais dos Ags-Recs e dos anti-isotipos foram estabelecidas após titulação dos mesmos. Para detecção dos isotipos utilizamos a metodologia do ELISA indireto, onde as placas de ELISA foram sensibilizadas com os Ags-Recs CRA ou FRA. As amostras de soro foram depositadas em duplicata nos poços. A ligação dos anticorpos específicos foi detectada pela incubação dos anti-isotipos (anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4) conjugados à biotina, seguida da incubação de estreptavidina conjugada à peroxidase. A quantificação da reação foi determinada através do leitor de ELISA a 490 nm. Os resultados foram analisados através de um índice de reatividade, onde as densidades ópticas das amostras foram divididas pelo *cut-off* (média dos controles negativos adicionada de dois desvios-padrão) de suas respectivas placas. Verificamos que a resposta imune humoral gerada pelos pacientes frente aos Ags-Recs foi bastante variada, com produção de quase todas as subclasses de IgG. Entretanto, apenas o isotipo IgG2 específico contra o Ag-Rec FRA foi capaz de diferenciar pacientes chagásicos portadores da forma CARD daqueles portadores da forma IND, podendo, após um estudo prospectivo, servir como marcador de evolução clínica para a forma cardíaca. Esta informação é importante, uma vez que permite ao médico avaliar a possibilidade de redirecionar a conduta do tratamento de seu paciente.

Palavras-chave: Perfil isotípico; Antígenos recombinantes; Doença de Chagas.

ABSTRACT

Chagas' disease is an important public health disorder in Latin America, where 18 million people are estimated to be infected. The wide range of clinical manifestations, of which heart involvement is the most significant in the case of Chagas' disease, because of its characteristics, frequency and consequences, and lack of treatment and cure, justify research in this area. The specific immunoglobulin G (IgG) antibody subclass has been associated with human Chagas' disease. Thus, in this study, the profile of IgG subclasses against two *T. cruzi* specific antigens was correlated with different clinical manifestations of Chagas' disease. At two hospitals located in Recife in the State of Pernambuco, Brazil we selected 60 patients with Chagas' disease, of whom 33 exhibited cardiac (CARD) manifestations, 7 had both cardiac and digestive manifestations and 20 had asymptomatic *T. cruzi* infection (IND). All patients were asked about their clinical status and whether they had received a positive diagnosis for Chagas' disease. We also selected 40 healthy individuals who had tested negative in serological tests for Chagas' disease (20 non-chagasic and 20 negative controls to calculate the cut-off). The inclusion of all subjects in our investigation had the approval of the Ethics Committees of the Aggeu Magalhaes Research Center. The recombinant antigens (Ags-Recs) CRA and FRA were analysed using SDS-PAGE, followed by a specific stain with silver and Schiff reagent confirming their integrity and lack of bacterial contamination. The optimal concentration of Ags-Recs and anti-isotypes was established by titration. In order to detect the isotypes, wells of polystyrene micotiter plate were coated with CRA or FRA. Serum samples were added in duplicate to each well and specific binding was detected using biotinylated anti-isotypes (anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 and anti-IgG4) followed by streptavidin-

horseradish peroxidase incubation. Optical density was determined (490nm) using an automated ELISA reader. Our results were analysed using a reactivity index, where the optical density of samples was divided by respective cut-off (negative control average plus two standard-deviations) of each plate. IgG subclasses were detected in almost all Chagas patients studied. Nevertheless, only specific IgG2 isotype FRA was found with a significant statistical difference in CARD patients when compared to IND patients. This result suggests the potential use of this isotype for prognostic purposes, for monitoring the progression of chronic Chagas' disease, and for predicting the risk of CARD damage. However, a follow-up study is necessary to confirm this result. This is important information, as it could help physicians to evaluate and manage the treatment of their patients.

Key words: Isotypic profile; Recombinant antigens; Chagas' disease.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 1-	Padronização das concentrações dos Ags-Recs CRA e FRA...	43
FIGURA 2-	Padronização das diluições dos anti-isotipos de IgG para o Ag-Rec CRA.....	44
FIGURA 3-	Padronização das diluições dos anti-isotipos de IgG para o Ag-Rec FRA.....	45
FIGURA 4-	SDS-PAGE dos Ags-Recs CRA e FRA de <i>Trypanosoma cruzi</i> purificados através de cromatografia de metal quelado, corado pela prata.....	50
FIGURA 5-	SDS-PAGE dos Ags-Recs CRA e FRA de <i>Trypanosoma cruzi</i> e da glicoproteína IgG2a de camundongo, corado pelo Ácido Periódico de Schiff.....	51
FIGURA 6 –	Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma CARD, frente ao Ag-Rec CRA.....	53
FIGURA 7 –	Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma MIS, frente ao Ag-Rec CRA.....	54
FIGURA 8 –	Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma IND, frente ao Ag-Rec CRA.....	55
FIGURA 9 –	Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma CARD, frente ao Ag-Rec FRA.....	56
FIGURA 10 –	Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma MIS, frente ao Ag-Rec FRA.....	57
FIGURA 11 –	Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma IND, frente ao Ag-Rec FRA.....	58
FIGURA 12 –	Índices de reatividade dos isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 de pacientes chagásicos crônicos portadores das formas CARD, MIS e IND, frente ao Ag-Rec CRA.....	60
FIGURA 13 –	Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores das formas CARD, MIS e IND, frente ao Ag-Rec FRA.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Grau <i>Celsius</i>
Ag(s)-Rec(s)	Antígeno(s) recombinante(s)
APS	Ácido periódico de <i>Schiff</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CARD	Forma cardíaca
CO	<i>Cut-off</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CRA	<i>Cytoplasmic Repetitive Antigen</i>
DIG	Forma digestiva
DNA	<i>DesoxiriboNucleic Acid</i>
DO	Densidade óptica
DP	Desvio-padrão
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FRA	<i>Flagellar Repetitive Antigen</i>
h	Hora
HC	Hospital das Clínicas
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina da classe G do tipo 1
IgG2	Imunoglobulina da classe G do tipo 2
IgG3	Imunoglobulina da classe G do tipo 3

IgG4	Imunoglobulina da classe G do tipo 4
IgM	Imunoglobulina da classe M
IND	Forma indeterminada
kDa	kilo Dalton
M	Molar
mA	Miliampere
min	Minuto
MIS	Forma mista
mL	Mililitro
n	Número de amostra
NC	Não-chagásico
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences Incorporation</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TA	Temperatura ambiente
Tw	<i>Tween 20</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco
xg	Aceleração da gravidade
%	Porcentagem

<	Menor que
=	Igual
>	Maior que
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

Pág.

FOLHA DE ROSTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Objetivos.....	21
1.1.1 Objetivo Geral.....	21
1.1.2 Objetivos Específicos.....	21
2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E IMUNES DA DOENÇA DE CHAGAS.....	23
2.1 Situação epidemiológica da doença de Chagas.....	23
2.2 Formas clínicas da doença de Chagas.....	24
2.3 O papel das imunoglobulinas na doença de Chagas.....	26
2.4 Os antígenos recombinantes CRA e FRA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
2.5 Perfil isotípico.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Análise da pureza dos Ags-Recs CRA e FRA.....	35
3.1.1 SDS-PAGE.....	35
3.1.2 Coloração pela prata.....	36
3.1.3 Coloração pelo reativo de Schiff.....	37
3.2 População do estudo.....	38

3.2.1 Local de seleção de pacientes chagásicos e de indivíduos saudáveis.....	38
3.2.2 Critérios de seleção de pacientes chagásicos e de indivíduos saudáveis.....	39
3.2.2 População selecionada.....	40
3.3 Aspectos éticos.....	40
3.4 Coleta das amostras.....	41
3.5 Diagnóstico etiológico.....	41
3.6 Determinação do perfil isotípico.....	42
3.6.1 Padronização das concentrações dos Ags-Recs.....	42
3.6.2 Padronização das diluições dos anti-isotipos.....	43
3.6.3 Determinação do perfil isotípico contra os Ags-Recs CRA ou FRA....	45
3.7 Análise estatística.....	47
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Análise da pureza dos Ags-Recs CRA e FRA.....	49
4.1.1 Coloração pela prata.....	49
4.1.2 Coloração pelo Ácido Periódico de <i>Schiff</i>	50
4.2 Diagnóstico etiológico.....	51
4.3 Avaliação das subclasses de IgG.....	52
4.3.1 Análise das subclasses de IgG em pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas utilizando o Ag-Rec CRA.....	52
4.3.2 Análise das subclasses de IgG em pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas utilizando o Ag-Rec FRA.....	55
4.4 Correlação dos isotipos com as formas clínicas.....	59
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÕES.....	72
7 PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
APÊNDICES.....	83

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	84
Apêndice B - Formulário de Pesquisa.....	85
Apêndice C – Artigo em preparação.....	86
ANEXO.....	102
Anexo A – Comissão de Ética do CPqAM/Fiocruz.....	103

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma enfermidade de características clínicas peculiares. Os indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico desta enfermidade, podem apresentar, após um período variável de tempo, uma das quatro formas clínicas mais freqüentes, que são a forma cardíaca (CARD), a forma digestiva (DIG), a forma mista (MIS) e a forma indeterminada (IND).

Pouco ainda se conhece sobre os mecanismos imunes e patogênicos que estão envolvidos na transição da fase aguda para a crônica, bem como os fatores que favorecem o desenvolvimento de uma determinada forma clínica (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 1996). Vários estudos têm demonstrado que a heterogeneidade clínica observada entre os pacientes chagásicos está associada a uma distinta e complexa relação parasita-hospedeiro, com o envolvimento direto do sistema imune (ANDRADE, 1999; GAZZINELLI & BRENER, 1991; POWELL & WASSOM, 1993).

A enfermidade é circunscrita a 15 países endêmicos na América Latina, onde se estima uma prevalência de infecção humana em cerca de 18 milhões de casos e que cerca de 120 milhões de pessoas estão sob o risco de contrair a infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Somando-se a isso, ainda não existe um medicamento eficaz para o tratamento e nenhuma vacina que previna a doença (CANÇADO, 1985).

Em virtude da magnitude da infecção, de sua elevada morbimortalidade, com destaque para a cardiopatia, que gera um grande impacto social e médico-trabalhista (MALTA, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005), além da quase ineficácia do tratamento etiológico, justificam-se estudos que visem à melhoria da qualidade de vida dos portadores da enfermidade de Chagas.

Com o intuito de tentar diferenciar os pacientes com potencial evolutivo para as formas clínicas severas, vários grupos de pesquisa tentam estabelecer marcadores biológicos de evolução do prognóstico da doença através de abordagens imunológicas. Alguns deles buscam por um padrão de imunoglobulinas associadas a um ou mais antígenos de *T. cruzi* que sejam capazes de diferenciar as formas clínicas e predizer seu potencial evolutivo. É por meio desta abordagem que o presente trabalho estudou a resposta imune humoral estabelecida pelo indivíduo chagásico frente a dois antígenos recombinantes de *T. cruzi*, e relacionar esta resposta com as formas clínicas CARD, DIG, MIS e IND da doença de Chagas.

Para tal finalidade, foram utilizados dois antígenos específicos de *T. cruzi*, o CRA e o FRA, obtidos através da tecnologia do DNA recombinante. Esses dois antígenos apresentam uma estrutura de epítomos repetitivos, e por este motivo o antígeno repetitivo que está localizado na região do flagelo recebeu o nome de *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA). Ele é encontrado nas formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*. Da mesma forma, o antígeno repetitivo que está localizado no citoplasma foi chamado de *Cytoplasmic Repetitive Antigen* (CRA), e está presente nas formas evolutivas epimastigota e amastigota do parasito (KRIEGER et al., 1992; LAFAILLE et al., 1989). A resposta imune frente a estes antígenos já foi extensivamente estudada experimentalmente (PEREIRA et al., 2003a, 2003b, 2004, 2005), e o potencial diagnóstico deles também já foi comprovado (GADELHA et al., 2003; GOMES et al., 2001). Não se conhece, porém, os isotipos de IgG que estão envolvidos na resposta imune humoral gerada por pacientes chagásicos frente a estes Ags-Recs.

A utilização de proteínas puras e quimicamente definidas e ainda, específicas do parasito, é sugerida por vários autores para fornecer maior especificidade aos

resultados na identificação de moléculas alvo de uma interação parasita-hospedeiro bem sucedida, e para estudar a imunopatologia da doença de Chagas (CERBAN et al., 1993; LORCA et al., 1992; MOTRAN et al., 1994). Assim, com a utilização das proteínas CRA e FRA, poderíamos avaliar os resultados de respostas imunes específicas durante a fase crônica da doença de Chagas, estabelecendo um perfil isotípico que discriminasse as diferentes formas clínicas da doença.

Existe uma grande diversidade de resultados obtidos pelos vários autores que dirigem seus esforços para estudar o tema. Alguns encontraram uma estreita associação entre as manifestações clínicas e o reconhecimento antígeno-específico (AZNAR et al., 1995), enquanto outros autores obtiveram resultados parciais, e às vezes até controversos para predizer a possibilidade de evolução da doença (MORGAN et al., 1996).

Considerando que os estudos realizados com antígenos complexos de *T. cruzi*, avaliando a resposta imune humoral, ainda não discriminaram completamente as diferentes formas clínicas da doença de Chagas, que estudos prévios sugerem a existência de uma relação entre o reconhecimento antígeno-específico e as formas clínicas da doença de Chagas (AZNAR et al., 1995), que a detecção de antígenos específicos por um isotipo particular de anticorpo sugere uma correlação com as manifestações clínicas da doença de Chagas (MORGAN et al., 1998), e que ainda não se conhecem os isotipos de IgG que estão envolvidos na resposta imune frente aos Ags-Recs CRA e FRA, a utilização destes Ags-Recs poderia evidenciar uma associação com o estado clínico dos pacientes.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Analisar a associação entre o perfil isotípico das imunoglobulinas G de pacientes chagásicos crônicos frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* e as formas clínicas da doença de Chagas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar o perfil isotípico das imunoglobulinas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, presentes no soro de indivíduos chagásicos crônicos, frente aos Ags-Recs CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*;
 - Correlacionar o perfil isotípico identificado com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas (CARD, DIG, MIS e IND).
-

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E IMUNES DA
DOENÇA DE CHAGAS**

2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E IMUNES DA DOENÇA DE CHAGAS

2.1 Situação epidemiológica da doença de Chagas

Apesar de estar próximo o centenário de descobrimento da doença, que foi descoberta em 1909 pelo médico Carlos Chagas, a infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, ainda representa um grande problema de saúde pública em 15 países endêmicos. A enfermidade é circunscrita à América Latina, onde se estima que a prevalência da infecção humana é cerca de 18 milhões de casos e que cerca de 40 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

No Brasil ainda existem cerca de 6 milhões de pessoas infectadas, com uma prevalência estimada em 0,13%, segundo inquéritos sorológicos realizados entre 1989 e 1990 (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Apesar de estar declarado livre da transmissão vetorial, o Brasil apresentará este quadro por muitas décadas. Isso decorre da característica crônica da enfermidade, e porque o risco da infecção ainda permanece, através das transfusões de sangue contaminado, da transmissão vertical, dos acidentes de laboratório e dos transplantes de órgãos contaminados, além de transmissões esporádicas por via oral. Há também a possibilidade do retorno da transmissão vetorial, já que o risco de reinfestação das habitações rurais em nosso país é permanente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Devido a pouca ou nenhuma expressão clínica que os indivíduos infectados apresentam na fase aguda da infecção, e do longo período de latência observado na fase crônica, há uma dificuldade de detecção destes indivíduos infectados e,

conseqüentemente, de introduzir o tratamento etiológico. Se iniciado na fase aguda ou na fase crônica recente, o tratamento é mais eficaz, porém as percentagens de cura ainda são divergentes (CANÇADO, 1985). Além disso, o seu potencial de cura parasitológica é dependente do tipo de cepa albergada pelo hospedeiro (ANDRADE et al., 1985). Já na fase crônica tardia, ainda faltam evidências concretas de benefício pós-tratamento. Somando-se a isso ainda não existe uma vacina que previna a doença.

2.2 Formas clínicas da doença de Chagas

Durante o curso da infecção chagásica, o indivíduo passa por uma fase clínica aguda, que dura cerca de 2 a 4 meses. Se a infecção ocorrer por meio natural, os indivíduos podem apresentar ou não os sinais de porta de entrada da infecção, que são o sinal de Romaña e o chagoma de inoculação. Quando a clínica é aparente, manifestações como febre, mal-estar, anorexia e cefaléia são freqüentes. Além disso, manifestações sistêmicas como o edema localizado ou generalizado, aumento de linfonodos, alterações exantemáticas, hepatomegalia, esplenomegalia, manifestações nervosas, além de comprometimento cardíaco podem ser observadas nesta fase (HUGGINS et al., 1996; PRATA, 2001).

No sangue circulante há uma elevada concentração de parasitos, que confirmam o diagnóstico nesta fase (GOMES, 1996). Devido à inespecificidade dos sintomas, o diagnóstico da infecção nesta fase torna-se raro (PRATA, 2001) e a possibilidade de cura parasitológica com o uso de tratamento específico diminui. Nesta fase, a mortalidade é baixa e assim, a maior parte dos indivíduos infectados evolui para a fase crônica (PRATA, 2001).

Na fase crônica, o indivíduo pode permanecer num período de latência pelo restante da vida, não apresentando sinais e sintomas quaisquer, apenas apresentando sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*. Os indivíduos infectados também podem vir apresentar, depois deste período de latência ou imediatamente após a fase aguda, alterações em vários sistemas e órgãos, acometendo predominantemente o coração, esôfago, cólon e sistema nervoso, o que vai caracterizar as diferentes formas clínicas desta fase (ANDRADE, 1999; PRATA, 2001).

A forma clínica indeterminada, ou o período de latência, é caracterizada pela ausência de alterações clínicas investigadas por eletrocardiograma, raios X contrastado de esôfago e intestino grosso e raios X de coração, além da ausência de sintomatologia, e por isso é considerada uma forma clínica de bom prognóstico, pelo menos em médio prazo (5 a 10 anos). Entretanto, ao serem examinados com mais profundidade, podem-se encontrar alterações cardíacas e/ou digestivas. Estas, por serem também ocasionalmente encontradas em indivíduos saudáveis, não possuem valor prognóstico definido (MACÊDO, 1999; MARIN-NETO et al., 2002; OLIVEIRA JR, 1996; PRATA, 2001).

Apesar de ser considerada de bom prognóstico, esta forma clínica é de grande interesse científico, visto que é nela que parece se decidir o destino do chagásico, podendo este permanecer assintomático ou evoluir com alterações cardíacas, digestivas ou nervosas (OLIVEIRA JR, 1996).

Cerca de 2% dos pacientes que apresentam a forma indeterminada evoluem para a forma cardíaca a cada ano, gerando um contingente de cerca de 20-30% de pacientes chagásicos com algum tipo de alteração cardíaca, seja ela estrutural ou funcional (PRATA, 2001). Diversos são os sintomas encontrados na cardiopatia

chagásica crônica, relacionados com quadros de insuficiência cardíaca, arritmias e tromboembolismo, seu caráter fibrosante, considerado o mais expressivo dentre as miocardites, além da morte súbita. Todo esse quadro torna esta forma clínica a mais importante dentre as formas clínicas desta doença, não somente por sua alta prevalência, mas principalmente por sua morbimortalidade (MALTA, 1996).

As manifestações digestivas acometem cerca de 15-20% dos pacientes chagásicos, com taxa de incidência de 1,1% ao ano (CASTRO et al., 1994). Ocorrem alterações da motilidade do tubo digestivo, acometendo principalmente o esôfago e o cólon, podendo ter como evolução máxima da doença a formação do megaesôfago e do megacólon. A sintomatologia apresentada pelos pacientes está na dependência do órgão atingido (VASCONCELOS, 1996). Também pode haver o acometimento de algum órgão do aparelho digestivo e do coração simultaneamente, caracterizando a forma clínica mista da doença de Chagas (GOMES, 1993).

Menos freqüentemente há alterações no sistema nervoso, caracterizando a forma clínica nervosa da doença (PRATA, 2001). Esta baixa freqüência deve-se ao fato de ser difícil o encontro de alterações de motricidade, de coordenação, do psiquismo, das manifestações de natureza compulsiva dentre a totalidade dos indivíduos chagásicos. Porém, o comprometimento do sistema nervoso é a base da etiopatogenia do megaesôfago e do megacólon (JARDIM, 1996).

2.3 O papel das imunoglobulinas na doença de Chagas

As imunoglobulinas ou anticorpos têm a propriedade de se ligarem especificamente com o antígeno que induziu sua formação e então poder agir direta ou indiretamente sobre este através de suas funções efetoras. Sendo assim, os

anticorpos podem neutralizar a invasão de organismos estranhos nas células do hospedeiro, opsonizar os antígenos, facilitando a ação do sistema complemento e promover a morte celular através das células *natural killer* (LAGES-SILVA, et al., 1987; LIMA-MARTINS et al., 1985; SONG et al., 1990). Entretanto, os anticorpos podem produzir um efeito indesejável no organismo se forem produzidos autoanticorpos, anticorpos idiotípicos autoreativos e deposição de imunocomplexos.

Existem vários tipos de anticorpos presentes durante a infecção chagásica e que podem desempenhar ou não algum papel na patogênese da doença: anticorpos líticos, anticorpos da sorologia convencional, anticorpos idiotípicos, autoanticorpos e os anticorpos naturais (GAZZINELLI et al., 1990; HERNÁNDEZ et al., 2003; KRETTLI & BRENER, 1982).

Sabe-se que os anticorpos líticos podem mediar a lise das formas tripomastigotas do *T. cruzi*, além de neutralizar estas formas evolutivas, impedindo, assim, a infecção de novas células (KRETTLI & BRENER, 1976; 1982). Além disso, também são responsáveis pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo, visto que apenas anticorpos líticos são capazes de mediar esta resposta (LIMA-MARTINS et al., 1985). Estes achados sugerem um papel protetor para estas imunoglobulinas na resistência do hospedeiro contra o *T. cruzi* (KRETTLI & BRENER, 1982). Esta hipótese foi corroborada em um estudo mais recente, desenvolvido por Cordeiro et al. (2001), no qual os níveis destes anticorpos eram maiores nos pacientes que apresentavam a forma IND, sendo baixos nos indivíduos portadores da forma CARD.

Os anticorpos da sorologia convencional não apresentam esta função protetora (KRETTLI & BRENER, 1982), sendo amplamente utilizados para o diagnóstico sorológico para infecção pelo *T. cruzi*. A detecção destes anticorpos após tratamento etiológico gera discordâncias sobre a efetividade do tratamento.

Isso ocorre porque o critério de cura atualmente estabelecido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005) refere que a cura só é confirmada após negatificação sorológica, porém a sorologia pode permanecer reagente até mesmo por décadas pós-tratamento (CANÇADO, 1999).

O envolvimento dos anticorpos como mediadores da reatividade celular na doença de Chagas humana foi sugerido pela demonstração de que anticorpos idiotípicos anti-epimastigota, isolados de soro de pacientes chagásicos, podiam ativar a proliferação celular *in vitro* (GAZZINELLI et al., 1990). Estes anticorpos idiotípicos também apresentam características estimulatórias diferentes, dependendo da forma clínica do paciente do qual eles foram isolados (REIS et al., 1993). Alguns estudos evidenciaram a presença de anticorpos (autoanticorpos), presentes em pacientes chagásicos e ausentes em indivíduos saudáveis ou com outras patologias, que são específicos para proteínas próprias, e que podem explicar algumas anormalidades funcionais nos órgãos acometidos durante o curso da infecção pelo *T. cruzi* (HERNÁNDEZ et al., 2003; STERIN-BORDA et al., 2005).

Resíduos galactosil α 1-3 galactose estão presentes em vários microrganismos, patogênicos (AVILA et al., 1989) e não-patogênicos (GALILI et al., 1988). Desta forma, indivíduos saudáveis e infectados produzem anticorpos naturais frente a este estímulo antigênico, com maior produção nestes últimos (TOWBIN et al., 1987). Na infecção chagásica estes anticorpos podem estar envolvidos na lise dos parasitos (GOZÁLEZ et al., 1996; MILANI & TRAVASSOS, 1988). Esse estímulo inespecífico, gerado pelos resíduos de carboidratos comuns entre agentes patogênicos e não-patogênicos, faz com que persistam os resultados positivos através da sorologia convencional após o tratamento etiológico dos pacientes chagásicos (GAZZINELLI et al., 1988; 1993).

Embora alguns achados científicos tenham sugerido que os anticorpos possuem um papel na imunopatologia da doença de Chagas, ainda há uma escassez de estudos que correlacionem a função dos anticorpos presentes com o estado clínico dos pacientes.

2.4 Os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*

Em 1989, Lafaille et al. caracterizaram molecularmente dois genes de *T. cruzi* que codificavam antígenos que possuíam uma estrutura de epítomos repetitivos. A localização celular destes antígenos também foi investigada, resultando na nomenclatura deles: um dos antígenos exibia uma estrutura de 14 aminoácidos que se repetiam, localizado no citoplasma das formas epimastigotas e amastigotas, recebendo o nome de *Cytoplasmic Repetitive Antigen* (CRA); o outro, com uma estrutura de 68 aminoácidos que se repetiam, localizado na região do flagelo adjacente ao corpo das formas epimastigota e tripomastigota recebeu o nome de *Flagellar Repetitive Antigen* (FRA).

Posteriormente, Krieger et al. (1990) verificaram que os genes que codificam estes dois antígenos são altamente polimórficos em diferentes cepas de *T. cruzi*. Embora polimórficos, estes antígenos são reconhecidos por soros de pacientes chagásicos (GOLDENBERG et al., 1991), e uma mistura de CRA e FRA foi proposta como reagente de diagnóstico da doença de Chagas (KRIEGER et al., 1992).

A partir destes estudos foi produzido um *kit* de diagnóstico sorológico para a infecção pelo *T. cruzi*, o EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos[®] (Bio-Manguinhos), que utiliza os Ags-Recs CRA e FRA em associação, produzidos através da tecnologia do DNA recombinante. Este kit foi bastante explorado no

sentido de detectar a infecção pelo *T. cruzi* em indivíduos chagásicos de área endêmica (GOMES et al., 2001), na triagem sorológica em bancos de sangue (GADELHA et al., 2003) e na avaliação da cura parasitológica após tratamento etiológico (SILVA et al., 2002), demonstrando ótima performance como teste de diagnóstico e de triagem sorológica da doença de Chagas, e como triagem inicial para avaliar a cura de pacientes chagásicos tratados etiológicamente.

Os Ags-Recs CRA e FRA também foram bastante estudados com relação às respostas imunes geradas experimentalmente em camundongos, e seu efeito protetor, com a proposta de avaliar seu potencial imunogênico para vacinação (PEREIRA et al., 2003a, 2003b).

Ambos Ags-Recs são capazes de gerar uma resposta imune humoral, em camundongos, após imunização. Os principais isotipos detectados após imunização foram IgG1 e IgG3 para CRA e IgG1 para FRA, sugerindo que estes isotipos poderiam estar relacionados com um efeito protetor em camundongos, ajudando a controlar a parasitemia após desafio (PEREIRA et al., 2003a). Posteriormente, verificou-se que, apesar de presentes, estes isotipos não foram capazes de controlar a infecção pelo *T. cruzi*, embora tenham aumentado o tempo de sobrevivência dos camundongos desafiados (PEREIRA et al., 2005).

Resposta imune celular específica também é gerada em camundongos após imunização (PEREIRA et al., 2003b, 2004, 2005), induzindo uma resposta protetora do tipo Th1 (PEREIRA et al., 2004), porém sem ser capaz de controlar a infecção pelo *T. cruzi*, embora também tenham aumentado o tempo de sobrevivência dos camundongos desafiados (PEREIRA et al., 2005).

Um estudo piloto já foi conduzido por Pereira et al. (2002), avaliando o potencial destes antígenos para detectarem citocinas como marcadores biológicos

da evolução das formas clínicas da doença de Chagas. Neste estudo, os Ags-Recs CRA e FRA foram capazes de estimular PBMC de pacientes chagásicos a produzir determinado padrão de citocinas intracitoplasmáticas avaliadas através de citometria de fluxo. Os resultados obtidos mostraram que FRA estimulou PBMC de pacientes com a forma CARD a produzirem IFN- γ e TNF- α e, CRA estimulou a produção de IL-10 por indivíduos portadores da forma IND da doença, sugerindo que os Ags-Recs, juntos, poderiam identificar distintos perfis de citocinas entre os indivíduos chagásicos portadores das diferentes formas clínicas crônicas da doença.

Com relação ao perfil isotípico detectado em indivíduos chagásicos, frente aos Ags-Recs CRA e FRA, nenhum estudo foi realizado até o momento. Sabe-se que anticorpos específicos para estes antígenos são produzidos por indivíduos chagásicos, como foi visto nos vários estudos realizados (GADELHA et al., 2003; GOMES et al., 2001). Porém, os isotipos que se destacam no reconhecimento destes antígenos, durante a infecção chagásica não são conhecidos.

2.5 Perfil isotípico

A comunidade científica que estuda os aspectos relacionados à imunidade humoral vem realizando seu trabalho através das várias técnicas imunológicas existentes, principalmente por meio do ELISA, da imunofluorescência indireta e da hemaglutinação. Os antígenos de *T. cruzi* utilizados para a avaliação das respostas imunes são variados. Atualmente a utilização de antígenos puros e específicos do parasita tem sido proposta para tal fim, porém vários estudos se apóiam em resultados obtidos com antígenos complexos do parasito.

Utilizando antígenos complexos de *T. cruzi*, Primavera et al. (1988, 1990) sugerem que a presença de anticorpos IgA específicos para a forma evolutiva amastigota do parasita está relacionada com o risco de progressão da doença com o desenvolvimento da forma DIG, em ambos pacientes portadores das formas IND e CARD. Morgan et al. (1996) demonstraram a associação entre os anticorpos IgA anti-epimastigota e a forma clínica DIG, mas não estabeleceu nenhum risco de progressão da doença para esta forma clínica. Este resultado difere do previamente obtido por Primavera et al. (1990), que obtiveram repostas inespecíficas desta imunoglobulina associada à forma epimastigota.

A descoberta dos anticorpos líticos em camundongos, que possuem função protetora, por Krettli e Brener (1976, 1982), levaram Cordeiro et al. (2001) a realizarem um estudo com a forma tripomastigota sanguínea viva, para avaliar os isotipos protetores presentes nos pacientes chagásicos. Estes autores conseguiram então demonstrar que o anticorpo lítico do isotipo IgG1 poderia ser utilizado para monitorar a progressão da doença de Chagas crônica, com o início de danos cardíacos, nos indivíduos com a forma IND.

Entretanto outros autores realizaram seus estudos utilizando antígenos purificados de *T. cruzi*, a fim de encontrar repostas anticórpicas mais específicas. Verificaram que o padrão de reconhecimento antigênico é bastante variável para as diferentes manifestações clínicas. A maioria não associou nenhum antígeno purificado ao risco de progressão da doença crônica (CERBAN et al., 1993; LORCA et al., 1992). Posteriormente, Aznar et al. (1995) demonstraram que o peptídeo R-13 induzia uma resposta imune humoral apenas em pacientes portadores da forma CARD, em comparação com pacientes portadores das formas DIG e IND da doença de Chagas.

Duschak et al. (2001) e Laucella et al. (1996) demonstraram que o monitoramento dos níveis de anticorpos monoclonais 5A9B11 seriam úteis para acompanhar a evolução da doença de Chagas crônica. Estes anticorpos possuem estreita relação com a resposta imune humoral anti-cruzipaína e a gravidade da doença. O monitoramento da resposta imune humoral de pacientes chagásicos com a forma CARD foi realizado por Zauza e Borges-Pereira (2001) durante um período de 10 anos. Por meio deste estudo, os autores verificaram que a progressão da cardiopatia chagásica crônica possui uma correlação positiva com o aumento dos títulos de IgG total para antígenos complexos de *T. cruzi*.

Também foi encontrado maiores níveis de IgM em pacientes portadores da forma CARD em comparação com pacientes portadores da forma IND, associando este resultado à hipótese da autoimunidade presente na doença de Chagas (MORGAN et al., 1996). Esta imunoglobulina é característica da fase aguda da doença de Chagas (UMEZAWA et al., 1996), porém ela também está presente na fase crônica, em virtude das alterações antigênicas na superfície do *T. cruzi* que ocorrem nesta fase (MAGNANI et al., 1973).

Entretanto, alguns autores não encontraram nenhuma associação entre a resposta imune humoral e o risco de progressão da doença nos pacientes com as diferentes manifestações clínicas com graus variáveis de comprometimento, utilizando tanto os antígenos complexos do parasito (GUSMÃO et al., 1982) como antígenos purificados (MICHAJLOWSKY et al., 2003) de *T. cruzi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 METODOLOGIA

Para determinarmos o perfil isotópico de pacientes chagásicos crônicos apresentando as formas clínicas IND, CARD e MIS, frente aos Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi*, realizamos várias etapas, que serão descritas a seguir:

3.1 Análise da pureza e integridade dos Ags-Recs CRA e FRA

Os Ags-Recs CRA e FRA, obtidos como descrito por Krieger et al. (1992), foram preparados no Laboratório de Reativos do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fiocruz e enviados para o Laboratório de Imunoparasitologia do CPqAM/Fiocruz em condições apropriadas.

Para obtenção de uma resposta imune humoral específica para os Ags-Recs em questão, através de ELISA, é necessário que eles estejam íntegros quanto à sua estrutura molecular e livres de contaminação por proteínas e carboidratos. A verificação da pureza e integridade dos Ags-Recs foi feita através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), seguida de colorações específicas para proteínas e carboidratos.

3.1.1 SDS-PAGE

A eletroforese uni-dimensional em gel de uma proteína fornece informações sobre o tamanho molecular e a pureza dela. A adição de um agente redutor, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), ainda permite determinar o número e o tamanho das subunidades de uma proteína pura.

O método de Laemmli (1970), no qual é realizada uma eletroforese em gel descontínuo sob condições de desnaturação, foi utilizado para analisar os Ags-Recs CRA e FRA. Neste método, as proteínas são separadas de acordo com seu tamanho molecular.

Sumariamente, os Ags-Recs foram submetidos à desnaturação na presença de SDS, a uma temperatura de 100°C, por 3min. Em seguida, dois géis foram preparados para serem, posteriormente, corados pela prata e pelo Ácido Periódico de *Schiff*. As concentrações de acrilamida dos géis de “empilhamento” e de “corrida” foram de 4,5% e 10%, respectivamente. Alíquotas dos Ags-Recs CRA (5µg) e FRA (3µg), previamente desnaturados, foram submetidas à SDS-PAGE, junto com o peso molecular (PM) (SIGMA, St. Louis, MO). Inicialmente, o gel foi submetido a uma corrente constante de 10mA, até que o tampão da amostra penetrasse no gel de corrida. Neste momento, a corrente foi aumentada para 15mA. A voltagem foi mantida aberta durante toda a corrida eletroforética. A eletroforese teve fim quando o tampão da amostra chegou ao final do gel de corrida.

3.1.2 Coloração pela prata

Terminada a corrida eletroforética, um dos géis foi submetido à coloração pela prata, de acordo com Morrissey (1981). Esta coloração permite localizar as bandas de proteínas no gel, onde a prata se liga a vários grupos químicos (p. ex. sulfidril e carboxila), com um limite de detecção de 2 a 5ng por banda de proteína.

Sumariamente, o gel foi fixado em três soluções: metanol a 50% contendo ácido acético a 10%, seguido de outra fixação em metanol a 5% contendo ácido acético 7% e por fim, fixado em glutaraldeído a 10%, durante 30 min em cada uma

das soluções. Em seguida, foram realizadas várias lavagens com água destilada, durante 2h. O gel foi, então, tratado com ditioneitol, a uma concentração de 5µg/mL, durante 30min. Após uma rápida lavagem com água destilada, o gel foi embebido em uma solução contendo nitrato de prata a uma concentração de 0,1%, durante 30min protegido da luz. Em seguida, após descartar a solução contendo a prata, adicionou-se a solução de revelação, composta por 50µl de formaldeído a 37% em 100mL de carbonato de sódio a 3%. O gel ficou embebido nesta solução até haver a precipitação da prata, com aparecimento das bandas de proteína. Neste momento a reação foi bloqueada com 5mL uma solução de ácido cítrico 2,3M durante 10min. O gel foi então lavado com água destilada e fotografado.

3.1.3 Coloração pelo Ácido Periódico de *Schiff*

O outro gel foi submetido à coloração pelo Ácido Periódico de *Schiff* (APS) (JANN, et al., 1975) a fim de verificar a presença de carboidratos contaminantes.

O ácido periódico tem a capacidade de oxidar os grupamentos glicol dos carboidratos, transformando-os em grupamentos aldeído. A fucsina básica presente no reativo de *Schiff* forma um complexo com os grupamentos aldeídos formados, produzindo um composto insolúvel vermelho.

Sumariamente, o gel foi fixado em ácido acético glacial a 7,5% durante 1h a temperatura ambiente (TA), seguido de uma incubação com solução aquosa de ácido periódico a 0,2%, durante 45min a 4°C. Após e sta incubação, a solução foi desprezada e o gel foi incubado, durante 45min a 4°C, protegido da luz, com o reativo de *Schiff*. O gel foi então lavado com ácido acético glacial a 10% para

aparecimento das bandas e posteriormente fotografado. O controle positivo utilizado neste gel foi uma glicoproteína (IgG2a).

3.2 População do estudo

3.2.1 Local de seleção dos pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis

Os pacientes chagásicos foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE), ambos situados na cidade de Recife-PE. Os indivíduos saudáveis foram selecionados na Região Metropolitana do Recife-PE.

O Hospital das Clínicas-HC da UFPE é uma instituição vinculada ao Ministério da Educação, com função básica de apoiar o ensino de graduação e pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde, atuando como hospital-escola e centro de pesquisa científica em todas as áreas da medicina, orientando operacionalmente para três focos básicos, a saber: ensino, pesquisa e extensão voltada a assistência à população, desempenhando importante papel como Hospital Referencial da Região.

O ambulatório de doença Chagas do HUOC-UPE é referência no estado de Pernambuco para o Nordeste, com mais de 2000 pacientes cadastrados e uma média de 1200 consultas por mês, procurando dar atenção integral ao paciente, não apenas com ações de tratamento, mas com o enfoque biopsicossocial.

3.2.2 Critérios de seleção dos pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis

Para uma caracterização isotópica fidedigna, tivemos que selecionar pacientes chagásicos que apresentassem as formas clínicas CARD, DIG, MIS e IND bem definidas e que não receberam o tratamento etiológico para infecção pelo *T. cruzi*. Esta seleção foi realizada por médicos dos ambulatórios de doença de Chagas do HC-UFPE e HUOC-UPE, com experiência no atendimento ao paciente chagásico.

Os pacientes chagásicos foram submetidos a exames clínico-laboratoriais que compreendiam: exame físico, raios X contrastado de esôfago, raios X de tórax, eletrocardiograma e sorologia para infecção pelo *T. cruzi*.

Foram categorizados como pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica aqueles que apresentaram alguma alteração no eletrocardiograma e/ou dilatação do coração, com ausência de dilatação do esôfago e/ou sem sintomatologia digestiva alta e baixa, e apresentando sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*.

Foram categorizados como pacientes portadores da forma DIG aqueles que apresentaram sintomatologia digestiva característica da fase crônica da doença de Chagas, comprovados através de raios X contrastado de esôfago, com megaesôfago e/ou megacólon, tratados cirurgicamente ou não, e apresentando sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*.

Foram categorizados como pacientes portadores da forma MIS, aqueles que, além das evidências encontradas para os portadores da cardiopatia chagásica crônica, também apresentaram megaesôfago e/ou megacólon, tratados cirurgicamente ou não, e apresentando sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*.

Foram categorizados como pacientes portadores da forma IND aqueles que não apresentaram nenhuma das alterações descritas para a forma CARD e DIG, e apresentaram sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*.

Foram considerados indivíduos saudáveis aqueles que apresentaram sorologia negativa para infecção pelo *T. cruzi* em dois testes sorológicos, nunca receberam transfusão de sangue e nem habitaram em área endêmica.

3.2.3 População selecionada

De acordo com os critérios acima estabelecidos, foram selecionados 65 pacientes chagásicos, com idades variando entre 22 e 82 anos dos quais 35 apresentavam a forma CARD, 2 a forma DIG, 7 a forma MIS e 21 a forma IND.

Também foram selecionados 40 indivíduos saudáveis, com idades entre 19 e 58 anos, dos quais 20 foram utilizados como grupo de indivíduos não-chagásicos (NC) para comparação com os grupos de indivíduos chagásicos, e os outros 20 foram utilizados para estabelecimento do ponto de corte ou *cut-off* (CO) (ver seções 3.6.1 a 3.6.3).

3.3 Aspectos éticos

Os pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis envolvidos neste estudo tiveram participação voluntária, assinando o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndice A) e responderam a um formulário de pesquisa (Apêndice B). A conduta de inclusão dos mesmos e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz (Anexo A).

3.4 Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada no Ambulatório de Doença de Chagas do HUOC-UPE e no Ambulatório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz), seguindo as normas de biossegurança.

Cinco mililitros de sangue foram coletados pelo sistema a vácuo, Vacutainer . O sangue foi deixado à TA até sua completa coagulação, seguido de uma centrifugação a 1500xg por 10min. O soro assim obtido foi aliquoteado e armazenado a -20°C. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do CPqAM e incorporadas à soroteca do mesmo.

3.5 Diagnóstico etiológico

Segundo o Ministério da Saúde (2005), é considerado indivíduo portador da doença de chagas crônica aquele que apresente positividade sorológica para IgG em pelo menos dois testes sorológicos de metodologias diferentes ou, quando da mesma metodologia, que os testes apresentem preparações antigênicas diferentes.

Como já havíamos selecionado pacientes com pelo menos uma sorologia positiva, utilizamos o *kit* EIE-Chagas-Biomanguinhos® (lote 054CE002Z), produzido por Bio-Manguinhos/Fiocruz, seguindo a orientação do fabricante, para confirmar a infecção pelo *T. cruzi*.

A ausência da infecção pelo *T. cruzi* nos indivíduos saudáveis foi confirmada pelos *kits* Premier Chagas' IgG ELISA (Lote TCE100.011) da empresa Meridian

Diagnostics, Inc., e pelo *kit* EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos® (Lote 014CR001Z), produzido por Bio-Manguinhos.

3.6 Determinação do perfil isotípico

Para determinarmos o perfil isotípico dos pacientes chagásicos, utilizamos a metodologia de ELISA indireto. Esta metodologia, introduzida em 1971 por Engvall e Perlmann, é hoje amplamente utilizada em uma variedade de ensaios, avaliando diferentes antígenos e anticorpos, em diferentes áreas da ciência (KEMENY, 1992; VENKATESAN & WAKELIN, 1993).

Inicialmente, padronizamos as concentrações ótimas dos Ags-Recs CRA e FRA, seguida das padronizações das diluições dos anti-isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 para cada Ag-Rec.

3.6.1 Padronização das concentrações dos Ags-Recs

Para determinarmos a concentração ideal dos Ags-Recs CRA e FRA, foram feitas diluições seriadas com fator 2 dos mesmos, partindo de 5µg/mL até 0,625µg/mL. Sete soros de pacientes chagásicos e três soros de indivíduos saudáveis foram utilizados. A imunoglobulina anti-IgG total conjugada à biotina (SIGMA, St. Louis, MO) foi diluída 1:40000. O CO foi estabelecido para cada placa calculando-se a média das densidades ópticas (DOs) dos indivíduos saudáveis adicionada de dois desvios-padrão (DP).

Foi escolhida a concentração de Ag-Rec que apresentou maiores DOs para os pacientes chagásicos e menor CO, levando-se também em consideração os

custos. Desta forma, para o Ag-Rec CRA, a concentração ideal foi de 5µg/mL (Figura 1A), e para o Ag-Rec FRA foi de 2,5µg/mL (Figura 1B).

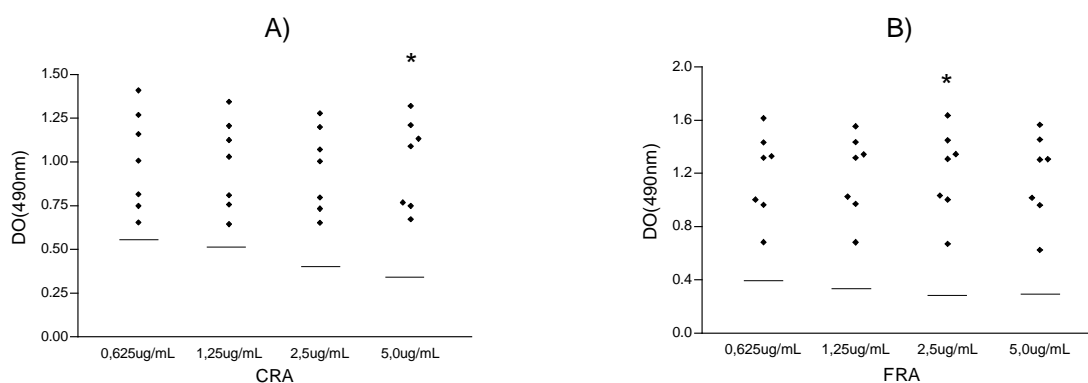


FIGURA 1 – Padronização das concentrações dos Ags-Recs CRA e FRA. O eixo das ordenadas apresenta as densidades ópticas das amostras a 490nm. As barras horizontais representam o *cut-off*. * = concentração escolhida. DO= densidade óptica.

3.6.2 Padronização das diluições dos anti-isotipos

Para determinarmos as diluições dos anti-isotipos de IgG para os Ags-Recs CRA e FRA, foram utilizados placas de ELISA sensibilizadas com CRA ou FRA nas concentrações de 5µg/mL e 2,5µg/mL, respectivamente. As imunoglobulinas anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 (SIGMA, St. Louis, MO) foram diluídas em série com fator 2, partindo de 1:1000 até 1:8000. Sete soros de pacientes chagásicos e três soros de indivíduos saudáveis foram utilizados.

Foi escolhida a diluição de cada isotipo que apresentou maiores DOs para os pacientes chagásicos e menor CO, levando-se também em consideração os custos. Desta forma, para o Ag-Rec CRA, a diluição da imunoglobulina anti-IgG1 foi de 1:4000 (Figura 2A), a da anti-IgG2 foi de 1:2000 (Figura 2B), a da anti-IgG3 foi de 1:4000 (Figura 2C) e a da anti-IgG4 foi de 1:4000 (Figura 2D). Para o Ag-Rec FRA,

a diluição da anti-IgG1 foi de 1:8000 (Figura 3A), a da anti-IgG2 foi de 1:1000 (Figura 3B), a da anti-IgG3 foi de 1:1000 (Figura 3C) e a da anti-IgG4 foi de 1:4000 (Figura 3D).

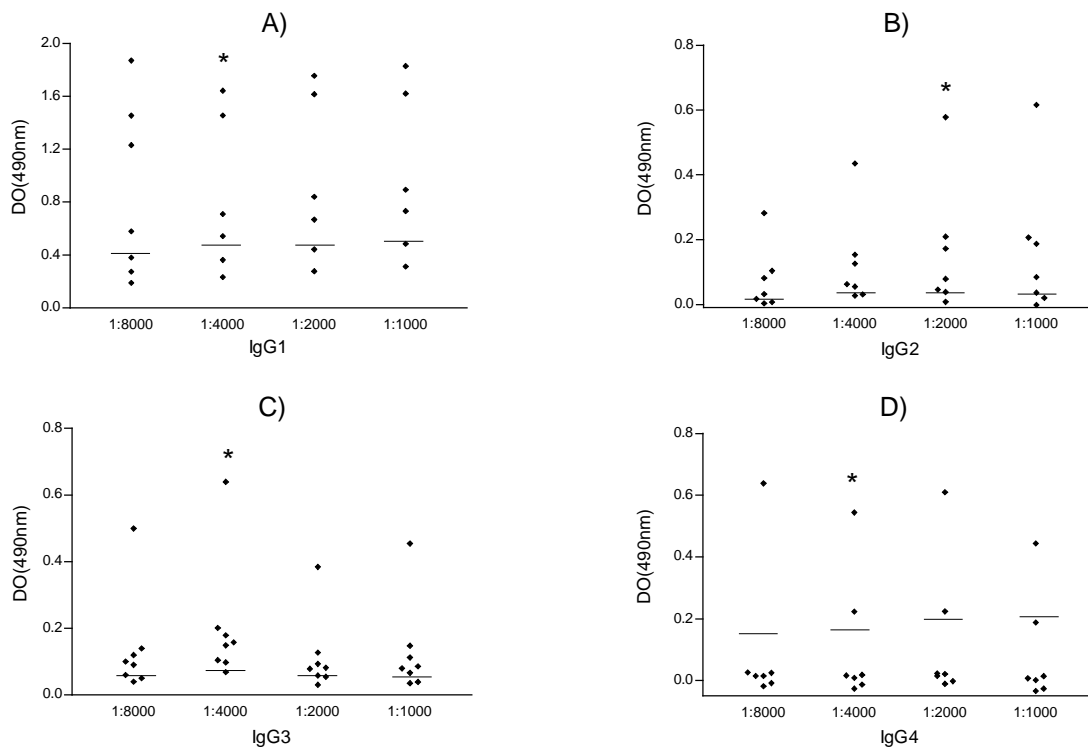


FIGURA 2 – Padronização das diluições dos anti-isotipos de IgG para o Ag-Rec CRA. O eixo das ordenadas apresenta as densidades ópticas das amostras a 490nm. As barras horizontais representam o *cut-off*. * = concentração escolhida. DO= densidade óptica.

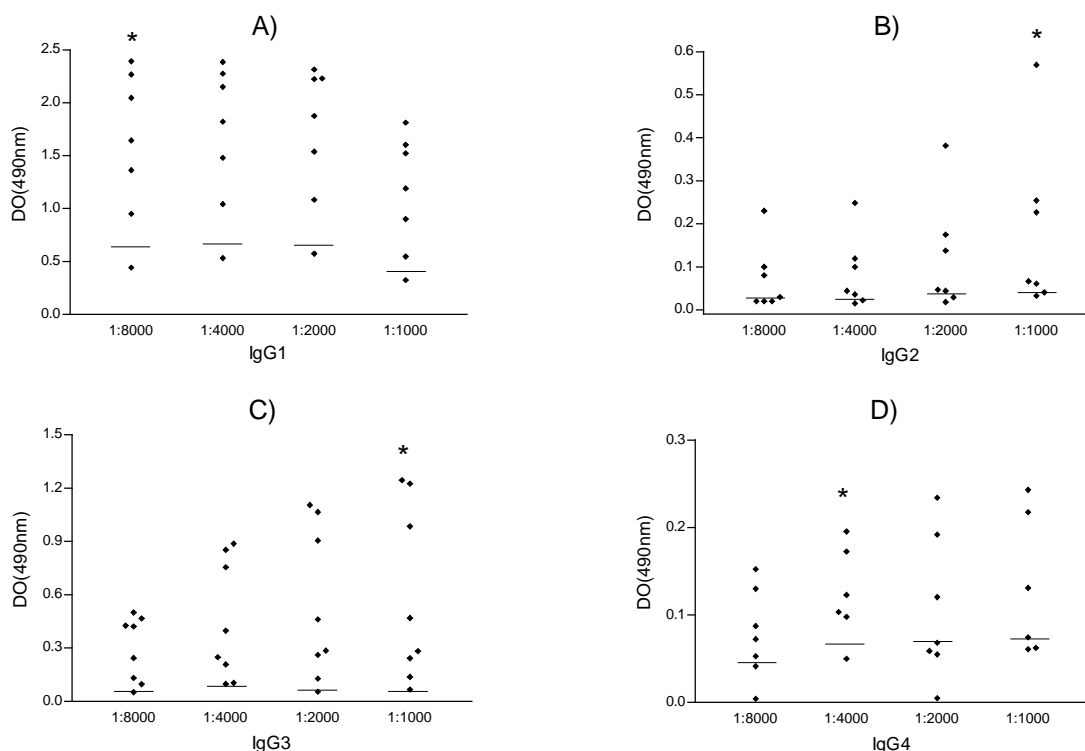


FIGURA 3 – Padronização das diluições dos anti-isotipos de IgG para o Ag-Rec FRA. O eixo das ordenadas apresenta as densidades ópticas das amostras a 490nm. As barras horizontais representam o *cut-off*. * = concentração escolhida. DO= densidade óptica.

3.6.3 Determinação do perfil isotípico contra os Ags-Recs CRA ou FRA

Placas de ELISA (Nunc-Immuno Plates, MaxiSorp, 96 poços, Nalge Nunc International Corporation) foram sensibilizadas com os Ags-Recs CRA ou FRA nas concentrações de 5 e 2,5µg/mL (100µL/poço), respectivamente, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 e incubadas “overnight” a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com 200µL de *Phosphate-buffered saline* (PBS) 0,157M contendo *Tween 20* (Tw) a 0,05% (PBS-Tw) (SIGMA, St. Louis, MO) e os sítios inespecíficos presentes nos poços foram bloqueados com 200µL de PBS-Tw contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) (SIGMA, St. Louis, MO) durante 4h à TA. Após o

bloqueio, uma nova etapa de lavagem foi realizada. Em seguida, os soros foram diluídos em PBS-Tw a 1:100 e 100µL foram depositados em duplicata nos poços, sendo posteriormente incubados “overnight” a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas como descrito anteriormente e a ligação dos anticorpos específicos foi detectada pela incubação (TA durante 1h30min) de 100µL dos anti-isotipos (anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4) conjugados à biotina (SIGMA, St. Louis, MO), diluídos em PBS-Tw contendo 0,1% de BSA nas diluições previamente estabelecidas, e incubadas à TA durante 1h30min. Após nova lavagem, as placas foram incubadas à TA durante 1h com 100µL estreptavidina conjugada à peroxidase (Pharmingen, San Jose, CA), diluída em PBS-Tw a 1:3000. Após a etapa de lavagem, a reação foi revelada pela adição de ortofenilenodiamina (0,01%) (SIGMA, St. Louis, MO) mais peróxido de hidrogênio (0,01%) (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), diluídos em tampão citrato-fosfato 0,077M, pH 5,0. A reação foi bloqueada pela adição de 100µL de ácido sulfúrico 2,5M. A quantificação da reação foi determinada através do leitor de ELISA (BIO-RAD 3550) a 490 nm.

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

3.7 Análise estatística

Foi utilizado o programa *Statistical Package for Social Sciences Incorporation*, US versão 8 (SPSS) para análise dos resultados. O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar se os índices calculados para cada isotipo apresentavam distribuição normal. Os testes não-paramétricos Mann-Whitney e Wilcoxon foram utilizados para avaliar as diferenças entre os índices calculados para cada amostra.

Os gráficos foram construídos utilizando-se o programa *Graphpad Prism* versão 3.0.

A diferença entre os resultados obtidos foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

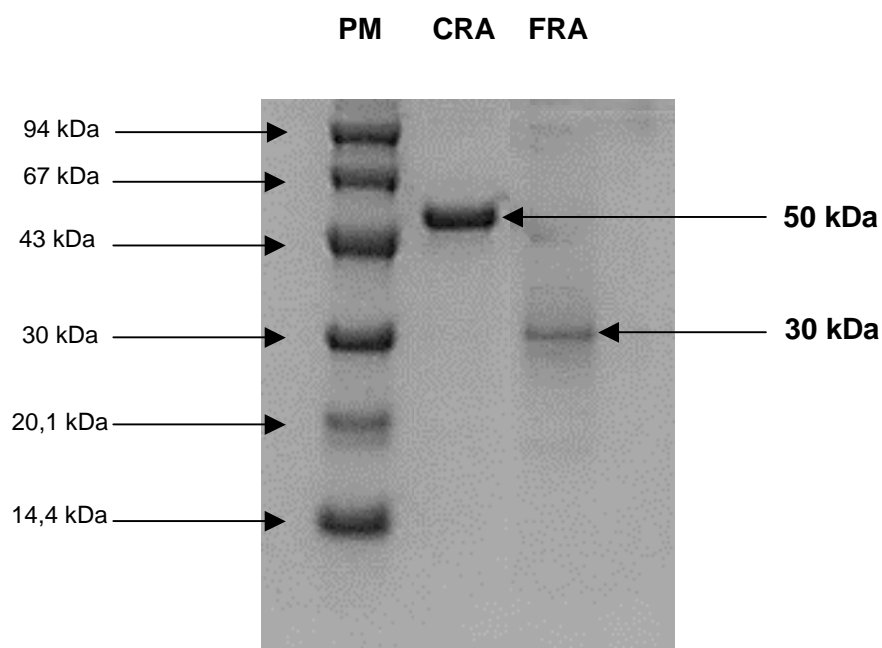
4.1 Análise da pureza dos Ags-Recs CRA e FRA

Para termos certeza de que a resposta imune humoral para os antígenos em questão foi específica, foi realizada uma SDS-PAGE dos Ags-Recs, seguida de colorações específicas para proteínas e carboidratos.

4.1.1 Coloração pela prata

A pureza e a integridade dos Ags-Recs CRA e FRA foram avaliadas após a eletroforese através de um gel de poliacrilamida a 10%, contendo SDS, e posteriormente corado pela prata (Figura 4).

Através deste gel podemos observar que o Ag-Rec CRA tem um peso molecular de 50kDa e o FRA tem 30kDa (PEREIRA et al., 2004), indicando a não-contaminação por proteínas derivadas da *Escherichia coli*, bactéria onde os Ags-Recs são produzidos. Além disso, também se pode observar que os Ags-Recs estão bem conservados, visto que não há degradação dos mesmos.



(Pereira et al., 2004)

FIGURA 4- SDS-PAGE dos Ags-Recs CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* purificados através de cromatografia de metal quelado, corado pela prata. PM = peso molecular em kilo Daltons (kDa) (fosforilase b -94, albumina sérica bovina - 67, ovalbumina - 43, anidrase carbônica - 30, inibidor trípico de soja - 20,1, e α -lactalbumina - 14,4). Em cada poço foram depositados 5 μ g e 3 μ g de CRA e FRA, respectivamente. CRA= *Cytoplasmic Repetitive Antigen*; FRA= *Flagellar Repetitive Antigen*.

4.1.2 Coloração pelo Ácido Periódico de Schiff

O gel corado pelo APS (Figura 5) não mostrou contaminação por carboidrato, pois nenhuma banda foi visualizada nas preparações contendo CRA ou FRA. As bandas de 55 e 22 kDa referentes à glicoproteína IgG2a, utilizada para controle positivo da reação, garantiu a confiabilidade da coloração pelo APS.

Visto que os Ags-Recs mostraram-se livres de contaminação, seja por proteínas ou carboidratos, e também íntegros quanto à sua estrutura molecular, eles poderão ser utilizados no ELISA para detecção dos isotipos de IgG produzidos por pacientes chagásicos frente a estes Ags-Recs.

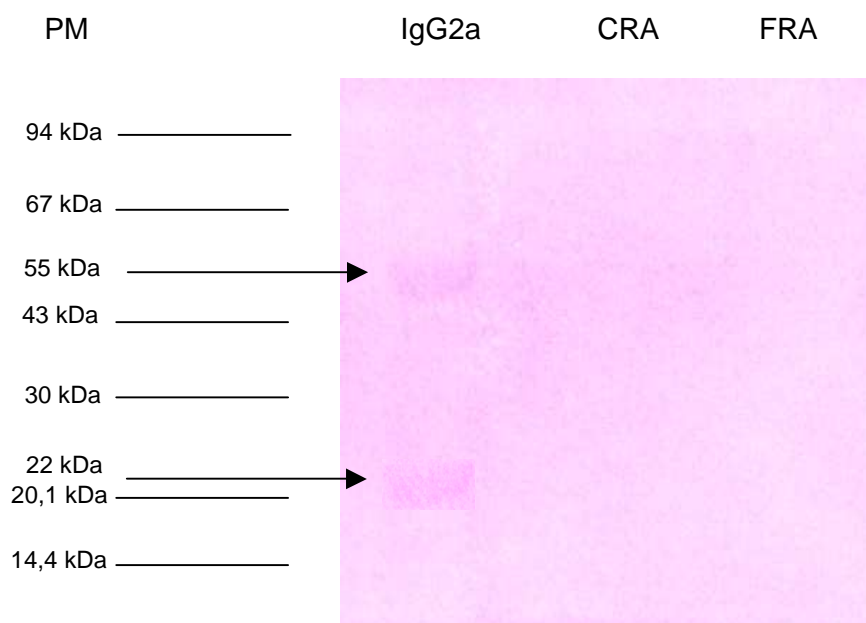


FIGURA 5 – SDS-PAGE dos Ags-Recs CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* e da glicoproteína IgG2a de camundongo, corado pelo Ácido Periódico de Schiff. PM = peso molecular em kilo Daltons (kDa) (fosforilase b - 94, albumina sérica bovina - 67, ovalbumina - 43, anidrase carbônica - 30, inibidor trípico de soja - 20,1, e α -lactalbumina - 14,4). Em cada poço foram depositados 5 μ g, 3 μ g e 5 μ g de IgG2a de camundongo, FRA e CRA, respectivamente. CRA= *Cytoplasmic Repetitive Antigen*; FRA= *Flagellar Repetitive Antigen*.

4.2 Diagnóstico etiológico

Foi utilizado o *kit* EIE-Chagas-Biomanguinhos (Bio-Manguinhos) para confirmar o diagnóstico etiológico dos 65 pacientes chagásicos previamente selecionados. Sessenta e dois pacientes chagásicos apresentaram reatividade para anticorpos anti-*T. cruzi*, sendo, então, incluídos no estudo de determinação do perfil isotípico das imunoglobulinas frente aos Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi*. Foram eliminados 3 pacientes que apresentaram reação negativa neste teste, sendo 1 da forma IND e 2 da forma CARD.

A ausência da infecção pelo *T. cruzi* nos 40 indivíduos saudáveis, previamente selecionados, foi confirmada pelos *kits* Premier Chagas' IgG ELISA (Meridian Diagnostics, Inc.), e pelo *kit* EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos (Bio-Manguinhos), sendo todos incluídos no estudo.

4.3 Avaliação das subclasses de IgG

Nas próximas seções iremos descrever os resultados que obtivemos a partir dos ELISAs que foram realizados com 60 amostras de soro de pacientes chagásicos distribuídos entre as formas clínicas CARD, MIS e IND e com 20 amostras de indivíduos NC.

Em virtude do tamanho amostral do grupo de pacientes chagásicos portadores da forma DIG, estes não foram incluídos no estudo, visto que não foi possível analisar estatisticamente os resultados obtidos.

Foram construídos gráficos a fim de facilitar a visualização dos resultados descritos no texto. Eles apresentam os resultados dos índices de reatividade de todas as amostras analisadas para cada isotipo, frente aos Ags-Recs CRA e FRA.

4.3.1 Análise das subclasses de IgG em pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas utilizando o Ag-Rec CRA

Analisando, de uma forma geral, a resposta imune humoral gerada por pacientes chagásicos portadores de diferentes formas clínicas, frente ao Ag-Rec CRA, verificamos que diversos isotipos de IgG são produzidos em resposta à presença deste Ag, com variados índices de reatividade para cada isotipo nas diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas (Figuras de 6 a 8).

Pacientes chagásicos portadores da forma CARD puderam ser diferenciados dos indivíduos NC através dos isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 específicos para o Ag-Rec CRA, visto que os índices de reatividade destes pacientes foram significativamente superiores aos dos indivíduos NC. Dentre esses três isotipos, IgG1 apresentou, significativamente, os maiores índices de reatividade comparados aos dos outros isotipos (IgG1 vs IgG2, $p < 0,001$; vs IgG3, $p = 0,05$; vs IgG4, $p < 0,001$), sendo a principal subclasse de IgG produzida frente ao Ag-Rec CRA, nestes pacientes. Secundariamente, o isotipo IgG3 apresenta, significativamente, índices de reatividade superiores aos do isotipo IgG2 ($p = 0,024$). O isotipo IgG4 apresenta os menores índices, não podendo ser diferenciado dos índices dos indivíduos NC (Figura 6).

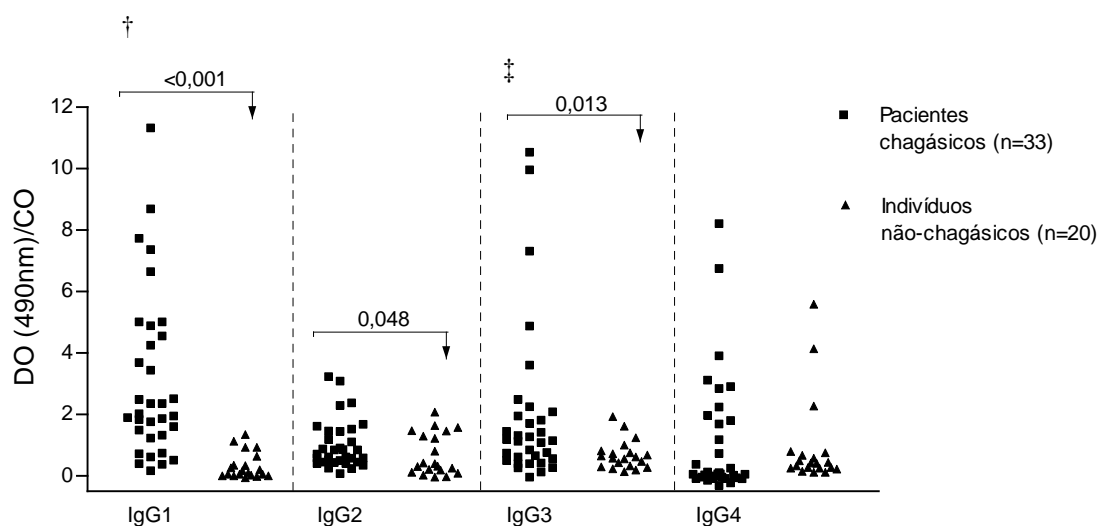


FIGURA 6 – Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma CARD, frente ao Ag-Rec CRA. O eixo das ordenadas apresenta os índices de reatividade, resultantes da divisão entre a média de densidade óptica de cada amostra pelo *cut-off*. Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra. Estão destacados os p-valores dos índices que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). † = isotipo que apresenta os maiores índices de reatividade. ‡ = isotipo que apresenta os segundos maiores índices de reatividade. CO = *cut-off*; DO = densidade óptica.

Pacientes portadores da forma MIS puderam ser diferenciados dos indivíduos NC através dos isotipos IgG1 e IgG3, visto que seus índices de reatividade foram significativamente superiores aos dos indivíduos NC. Na resposta imune humoral gerada por esses pacientes frente ao Ag-Rec CRA, não houve diferença estatisticamente significativa entre a produção destes dois isotipos ($p= 0,735$). Os índices de reatividade dos isotipos IgG2 e IgG4 foram baixos o suficiente para não diferenciá-los dos índices dos indivíduos NC (Figura 7).

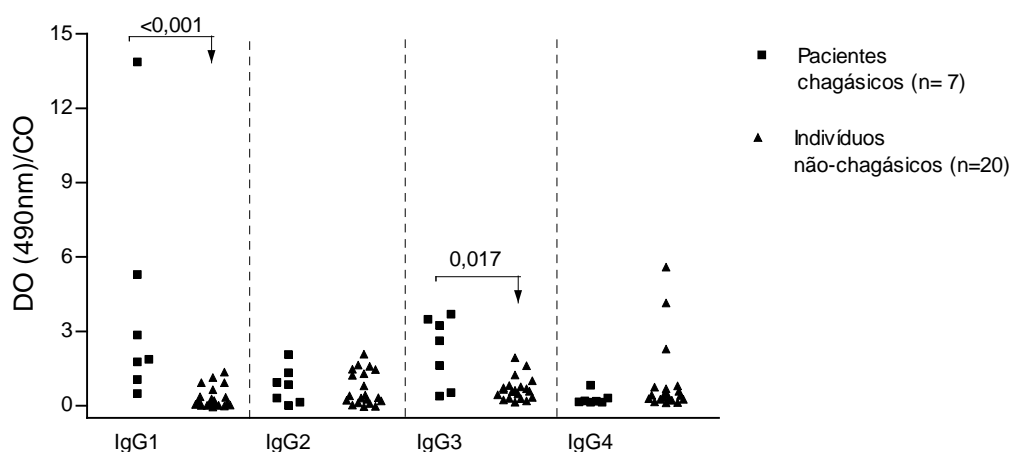


FIGURA 7 – Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma MIS, frente ao Ag-Rec CRA. O eixo das ordenadas apresenta os índices de reatividade, resultantes da divisão entre a média de densidade óptica de cada amostra pelo *cut-off*. Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra. Estão destacados os p-valores dos índices que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). CO= *cut-off*, DO= densidade óptica.

Com relação aos pacientes portadores da forma IND, apenas o isotipo IgG1 foi capaz de diferenciá-los dos indivíduos NC, visto que seus índices de reatividade foram significativamente superiores aos dos indivíduos NC. Todos os outros

isotipos apresentaram índices de reatividade comparáveis aos dos indivíduos NC, não podendo, portanto, serem distinguidos destes (Figura 8).

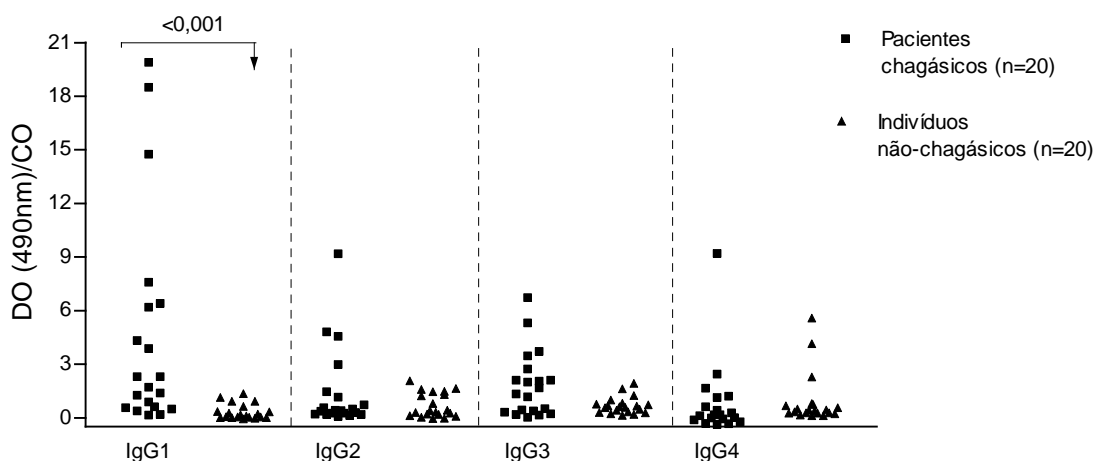


FIGURA 8 – Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma IND, frente ao Ag-Rec CRA. O eixo das ordenadas apresenta os índices de reatividade, resultantes da divisão entre a média de densidade óptica de cada amostra pelo *cut-off*. Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra. Estão destacados os p-valores dos índices que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). CO= *cut-off*; DO= densidade óptica.

4.3.2 Análise dos isotipos de IgG em pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas utilizando o Ag-Rec FRA

A resposta imune humoral gerada por pacientes chagásicos portadores de diferentes formas clínicas frente ao Ag-Rec FRA também foi bastante variada quanto à produção das subclasses de IgG, com variados índices de reatividade para cada isotipo nas diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas (Figuras de 9 a 11).

Frente ao Ag-Rec FRA, os pacientes portadores da forma CARD puderam ser diferenciados dos indivíduos NC através de todas as subclasses de IgG, visto

que os índices de reatividade de todos os isotipos analisados foram superiores, significativamente, aos dos indivíduos NC (Figura 9). Com relação à superioridade de um isotipo com relação ao outro, na resposta imune humoral gerada por estes pacientes frente ao Ag-Rec FRA, houve diferenças significativas entre todos eles, sendo IgG1 a principal subclasse produzida (IgG1 vs IgG2, $p < 0,001$; vs IgG3, $p = 0,001$; vs IgG4, $p < 0,001$), seguida da IgG3 (IgG3 vs IgG2, $p = 0,001$; vs IgG4, $p < 0,001$), IgG2 (IgG2 vs IgG4, $p < 0,001$) e IgG4.

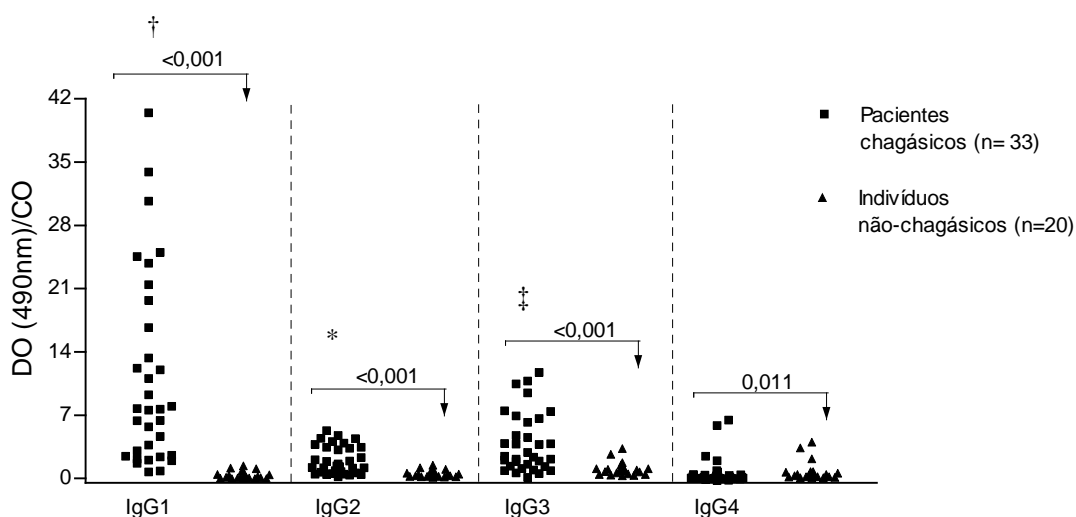


FIGURA 9 – Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma CARD, frente ao Ag-Rec FRA. O eixo das ordenadas apresenta os índices de reatividade, resultantes da divisão entre a média de densidade óptica de cada amostra pelo *cut-off*. Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra. Estão destacados os p-valores dos índices que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). †= isotipo que apresenta os maiores índices de reatividade; *= isotipo que apresenta o terceiro maior índices de reatividade; ‡= isotipo que apresenta o segundo maior índice de reatividade; CO= *cut-off*; DO= densidade óptica.

Pacientes chagásicos portadores da forma MIS puderam ser diferenciados dos indivíduos NC através dos isotipos IgG1, IgG2 e IgG3, visto que seus índices de reatividade foram significativamente superiores aos dos indivíduos NC. Na resposta imune humoral gerada por esses pacientes frente ao Ag-Rec FRA, o

isotipo IgG1 apresentou, significativamente, os maiores índices de reatividade comparados aos dos outros isotipos (IgG1 vs IgG2, $p= 0,18$; vs IgG3, $p= 0,043$; vs IgG4, $p= 0,18$), sendo a principal subclasse de IgG produzida frente ao Ag-Rec FRA. Secundariamente, a produção dos isotipos IgG2 e IgG3 nestes pacientes foi semelhante ($p= 0,176$) (Figura 10).

Através do isotipo IgG4 não foi possível diferenciar pacientes portadores da forma MIS dos indivíduos NC, visto que os índices de reatividade deste isotipo, tanto nos pacientes chagásicos como nos indivíduos NC foram comparáveis (Figura 10).

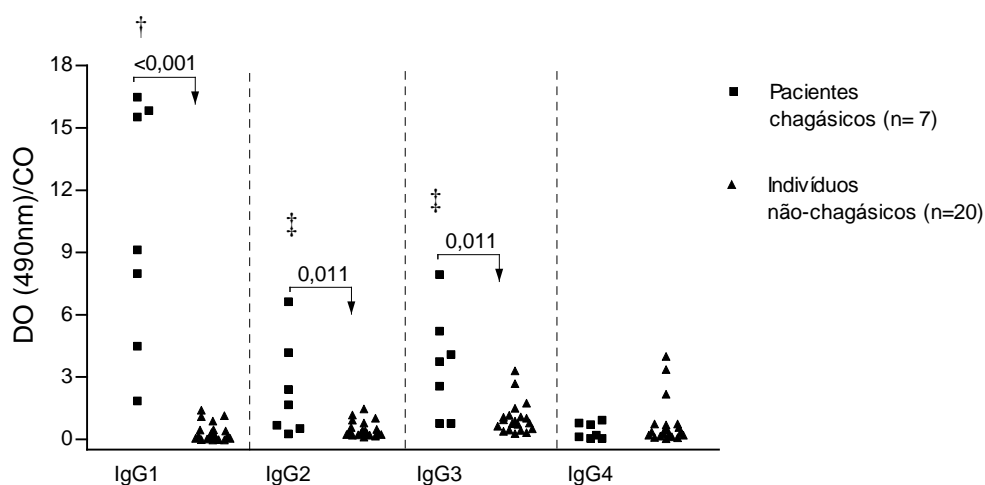


FIGURA 10 – Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma MIS, frente ao Ag-Rec FRA. O eixo das ordenadas apresenta os índices de reatividade, resultantes da divisão entre a média de densidade óptica de cada amostra pelo *cut-off*. Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra. Estão destacados os p-valores dos índices que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). † = isotipo que apresenta os maiores índices de reatividade comparados aos dos outros isotipos; ‡ = isotipos que apresentam os segundos maiores índices de reatividade; CO = *cut-off*; DO = densidade óptica.

Já os pacientes portadores da forma IND, frente ao Ag-Rec FRA, puderam ser diferenciados dos indivíduos NC através de todas as subclasses de IgG, visto

que os índices de reatividade de todos os isotipos analisados foram significativamente superiores aos dos indivíduos NC. Com relação à superioridade de um isotipo com relação ao outro, na resposta imune humoral gerada por estes pacientes frente ao Ag-Rec FRA, o isotipo IgG1 foi a principal subclasse produzida (IgG1 vs IgG2, $p=0,010$; vs IgG3, $p=0,028$; vs IgG4, $p<0,001$), seguida da IgG2 e da IgG3, que apresentaram índices de reatividade semelhantes entre si ($p=0,052$) e superiores aos da IgG4 (IgG2 vs IgG4, $p=0,006$; IgG3 vs IgG4, $p=0,001$) (Figura 11).

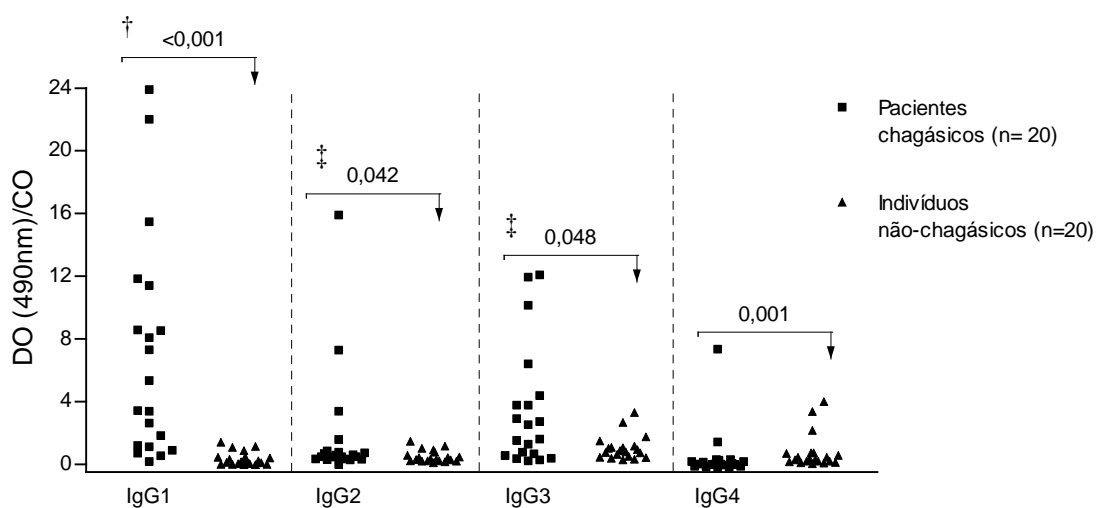


FIGURA 11 – Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma IND, frente ao Ag-Rec FRA. O eixo das ordenadas apresenta os índices de reatividade, resultantes da divisão entre a média de densidade óptica de cada amostra pelo *cut-off*. Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra. Estão destacados os p-valores dos índices que apresentaram diferença significativa ($p<0,05$). † = isotipo que apresenta os maiores índices de reatividade comparados aos dos outros isotipos. ‡ = isotipos que apresentam os segundos maiores índices de reatividade. CO = *cut-off*; DO = densidade óptica.

4.4 Correlação dos isotipos com as formas clínicas

A partir das análises descritas nas seções anteriores, selecionamos as respostas isotípicas, frente aos Ags-Recs CRA e FRA, que poderiam ter valor na diferenciação de pacientes chagásicos portadores das formas clínicas CARD, MIS e IND.

Frente ao Ag-Rec CRA, o isotipo IgG1 foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos portadores das formas CARD, MIS e IND dos indivíduos NC (Figuras 6, 7 e 8). Entretanto, não houve diferença significativa entre os índices de reatividade, para este isotipo, entre os pacientes portadores da forma CARD, MIS e IND (Figura 12A).

Com relação ao isotipo IgG2, vimos que apenas pacientes portadores da forma CARD puderam ser diferenciados dos indivíduos NC através deste isotipo (Figuras 6, 7 e 8). Entretanto, estes pacientes chagásicos não puderam ser diferenciados dos pacientes portadores das formas MIS e IND, visto que a reatividade para este isotipo não apresentou diferença estatisticamente significativa entre estes grupos de indivíduos chagásicos (Figura 12B).

Apesar do isotipo IgG3 poder diferenciar pacientes chagásicos, portadores das formas CARD e MIS, dos indivíduos NC (Figuras 6, 7 e 8), os índices de reatividade deste isotipo não apresentaram diferença entre estas duas formas clínicas. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os índices de reatividade, para este isotipo, entre os pacientes portadores da forma CARD ou MIS e os pacientes portadores da forma IND (Figura 12C).

Como o isotipo IgG4 não foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos com diferentes manifestações clínicas dos indivíduos NC (Figuras 6, 7 e 8), não

selecionamos este isotipo para diferenciar os pacientes chagásicos participantes do estudo.

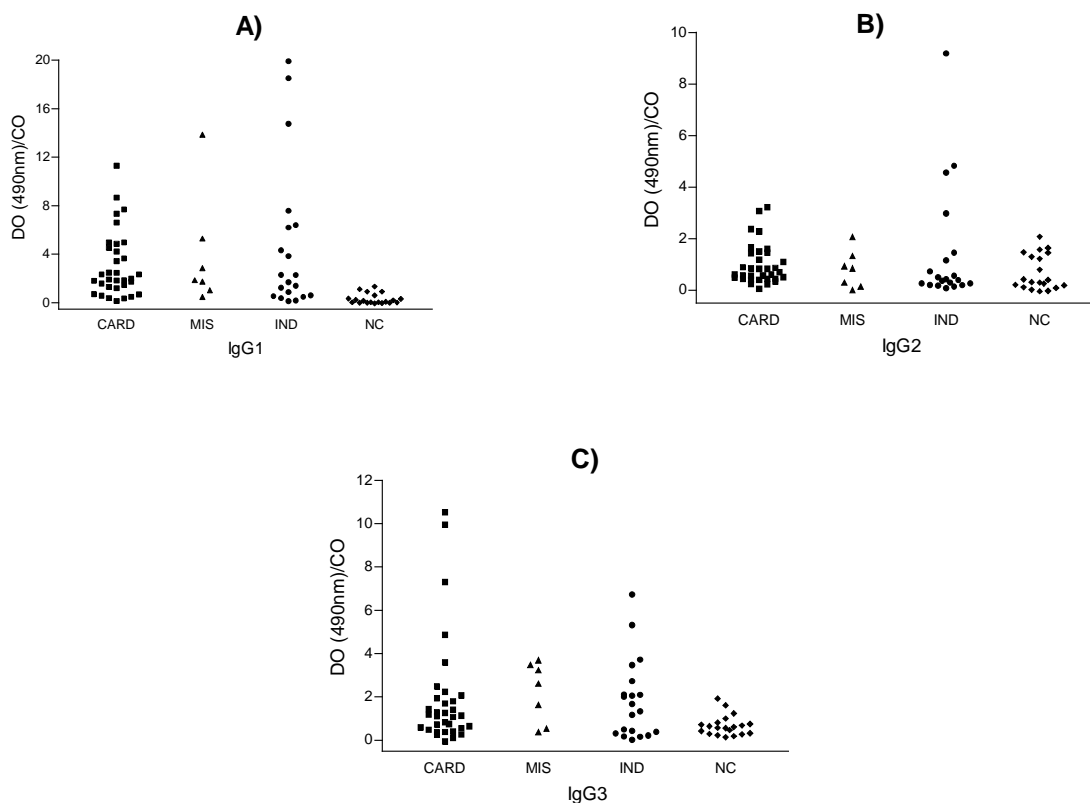


FIGURA 12 – Índices de reatividade dos isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 de pacientes chagásicos crônicos portadores das formas CARD, MIS e IND, frente ao Ag-Rec CRA. O eixo das ordenadas apresenta os índices de reatividade, resultantes da divisão entre a média de densidade óptica de cada amostra pelo *cut-off*. Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra. CO= *cut-off*, DO= densidade óptica; CARD= forma cardíaca (n= 33); MIS= forma mista (n= 7); IND= forma indeterminada (n= 20) e NC= não-chagásico (n= 20).

Frente ao Ag-Rec FRA, o isotipo IgG1 foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos portadores das formas CARD, MIS e IND dos indivíduos NC (Figuras 9, 10 e 11). Entretanto, não houve diferença significativa entre os índices de reatividade, para este isotipo, entre os pacientes portadores da forma CARD, MIS e IND (Figura 13A).

Com relação ao isotipo IgG2, vimos que todos os pacientes chagásicos portadores das diferentes manifestações clínicas puderam ser diferenciados dos indivíduos NC através deste isotipo (Figuras 9, 10 e 11). Este isotipo também foi capaz de diferenciar pacientes chagásicos portadores das formas CARD e IND, visto que os índices de reatividade do primeiro grupo de pacientes foram significativamente superiores aos do segundo grupo ($p= 0,010$). Pacientes portadores da forma MIS não puderam ser diferenciados, através deste isotipo, dos pacientes portadores das formas CARD e IND (Figura 13B).

Apesar de o isotipo IgG3 poder diferenciar pacientes chagásicos portadores das formas CARD, MIS e IND dos indivíduos NC (Figuras 9, 10 e 11), este isotipo não foi capaz de diferenciar as diferentes formas clínicas da doença de Chagas (Figura 13C).

Situação semelhante ocorreu com o isotipo IgG4, que foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos portadores das formas CARD e IND dos indivíduos NC (Figuras 9, 10 e 11), porém não foi capaz de diferenciar os pacientes portadores destas formas, e nem diferenciá-los dos pacientes portadores da forma MIS (Figura 13D).

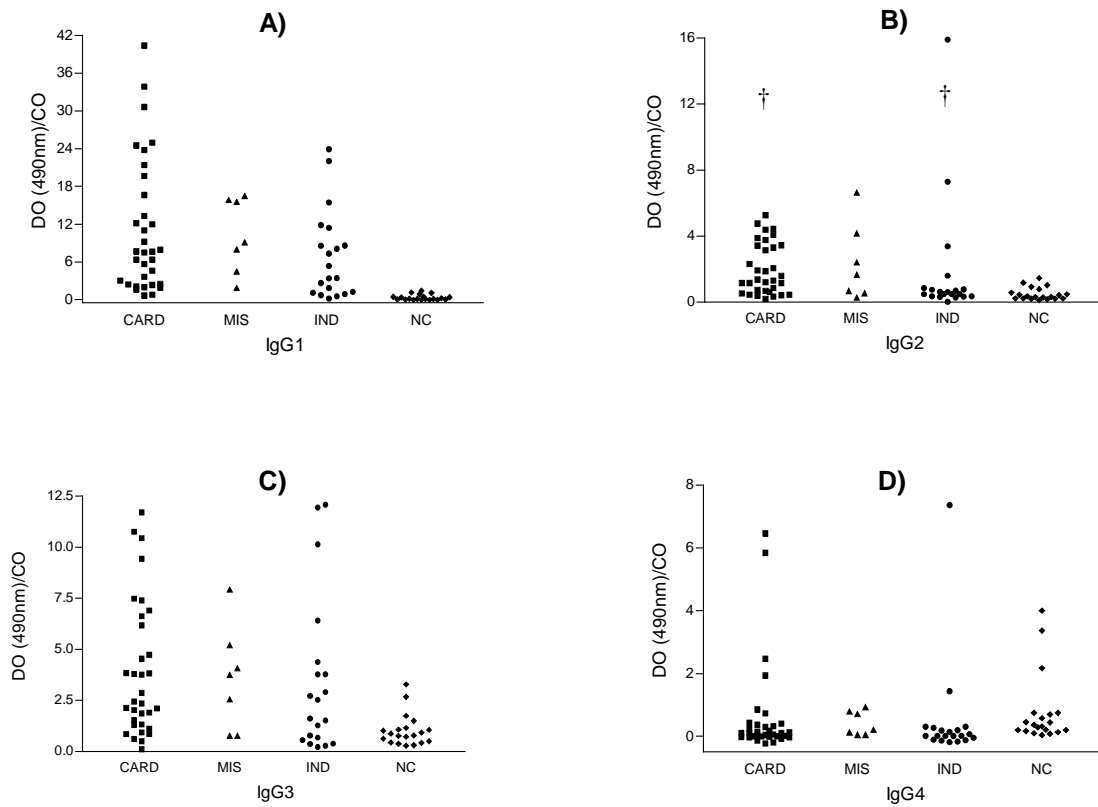


FIGURA 13 – Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores das formas CARD, MIS e IND, frente ao Ag-Rec FRA. O eixo das ordenadas apresenta os índices de reatividade, resultantes da divisão entre a média de densidade óptica de cada amostra pelo *cut-off*. Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra. † = isotipos que podem ser diferenciados através deste isotipo ($p= 0,010$). CO= *cut-off*; DO= densidade óptica; CARD= forma cardíaca ($n= 33$); MIS= forma mista ($n= 7$); IND= forma indeterminada ($n= 20$) e NC= não-chagásico ($n= 20$).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A existência de um amplo espectro de manifestações clínicas da fase crônica na doença de Chagas, variando de pacientes que não apresentam nenhum sintoma até aqueles que apresentam severas complicações cardíacas e digestivas, ainda desperta o interesse de vários grupos de pesquisa. Isso se deve ao fato de ainda não haver explicação para o polimorfismo clínico apresentado na enfermidade de Chagas.

A diferenciação das formas clínicas é feita atualmente através do eletrocardiograma e das radiografias de tórax e de abdômen, além da anamnese do paciente. Porém, quando se deseja investigar alterações precoces cardíacas e digestivas, esta avaliação convencional torna-se inadequada. Técnicas propedêuticas mais sensíveis estão sendo utilizadas para a detecção de alterações cardíacas mais precoces do indivíduo com a forma indeterminada. Porém, os dados fornecidos pelas técnicas atualmente utilizadas ainda são insuficientes para a detecção de alterações incipientes do aparelho digestivo (OLIVEIRA JR, 1996).

Alguns autores, ao realizarem um estudo prospectivo para avaliar a evolução do megaesôfago em indivíduos com esofagograma normal ou com diversos graus de evolução, utilizando as técnicas propedêuticas concluíram que, com o passar do tempo, muitos deles evoluíram para o megaesôfago, porém não se podem prognosticar quais são esses pacientes com potencial evolutivo e nem se pode fazer a prevenção da evolução (CASTRO et al., 1994). Desta forma, os métodos propedêuticos não-invasivos atualmente existentes não conseguem discriminar os pacientes com potencial evolutivo para as diferentes formas clínicas da doença, eles apenas revelam a situação clínica atual (OLIVEIRA JR, 1996).

A pesquisa de imunoglobulinas específicas no soro de indivíduos chagásicos, juntamente com a utilização de antígenos puros e específicos, poderiam formar um conjunto chave para a elucidação de alguns fatores que estariam envolvidos na indução e manutenção das manifestações clínicas da doença (CERBAN et al., 1993; LORCA et al., 1992; MOTRAN et al., 1994). Adicionalmente, poderíamos obter importantes informações que pudessem contribuir para a busca de um marcador de evolução de prognóstico das formas clínicas da doença de Chagas.

Os Ags-Recs CRA e FRA, proteínas específicas do *T. cruzi*, foram utilizados neste estudo com o objetivo de evidenciar uma associação entre a resposta imune humoral específica gerada por pacientes chagásicos e o estado clínico destes pacientes. A metodologia de ELISA foi a escolhida por já ser bem estabelecida há três décadas, além de ser de fácil execução (KEMENY, 1992).

De acordo com os critérios estabelecidos na seção Metodologia item 3.2.3, conseguimos selecionar 60 pacientes chagásicos portadores das formas clínicas crônicas CARD, MIS e IND. Também selecionamos vinte indivíduos saudáveis para servir como grupo de indivíduos não-chagásicos e outros vinte para o cálculo do *cut-off*.

Assim, analisamos inicialmente a resposta imune humoral, constituída pelas subclasses de IgG, gerada pelos pacientes chagásicos frente aos Ags-Recs CRA e FRA de *T. cruzi*, verificando as possíveis diferenças entre as respostas, para cada Ag-Rec. Posteriormente analisamos, para cada grupo de forma clínica, os isotipos que são predominantes nas respostas específicas, seguido da diferenciação dos grupos de formas clínicas CARD, MIS e IND através dos isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, quando possível.

O *T. cruzi*, assim como outros agentes patógenos, tem a capacidade de ativar o sistema imune, levando ao aparecimento de respostas imunes humorais e celulares, importantes no controle da infecção (REINA-SAN-MARTÍN et al., 2000). Apesar de protetora, esta resposta imune também pode contribuir para o aparecimento das manifestações clínicas crônicas presentes na doença de Chagas (BRODSKYN & BARRAL-NETTO, 2000).

As imunoglobulinas têm participação efetiva na infecção chagásica desde a fase aguda, onde são gerados anticorpos específicos principalmente para os antígenos superficiais do *T. cruzi*. Na fase crônica há uma maior diversidade de imunoglobulinas, sendo estas específicas principalmente para antígenos internos do parasita (UMEZAWA et al., 1996). Além das respostas anticórpicas serem geradas contra diferentes antígenos nas fases aguda e crônica da doença, elas também são variadas quanto aos isotipos produzidos em cada fase e nas diferentes formas clínicas da doença (GONZÁLEZ et al., 1996; GUSMÃO et al., 1982; LORCA et al., 1992; MORGAN et al., 1996).

Através dos ELISAs realizados no presente trabalho pudemos confirmar que os pacientes chagásicos desenvolvem uma resposta imune humoral frente aos Ags-Recs CRA e FRA. Entretanto, os vários trabalhos publicados apenas revelam o potencial diagnóstico destes Ags-Recs sem, contudo, identificar as subclasses de IgG que predominam nas respostas imunes identificadas (GADELHA et al., 2003; GOLDENBERG et al., 1991; GOMES et al., 2001; SILVA et al., 2002).

Nos pacientes chagásicos que selecionamos, as respostas imunes geradas foram bastante diversificadas com relação às subclasses de IgG produzidas e às formas clínicas nas quais elas estavam presentes, tanto para o Ag-Rec CRA como para o Ag-Rec FRA. Estas respostas foram constituídas principalmente pelos

isotipos IgG1 e IgG3, podendo estes diferenciar a maioria dos pacientes chagásicos dos indivíduos NC. Também estavam presentes os isotipos IgG2 e IgG4, este último sempre apresentando os menores índices, além de menor capacidade de discriminação entre indivíduos infectados e os não infectados.

Trabalhos mostram uma diversidade de respostas imune humoral encontrada nas formas clínicas, levando a crer que as imunoglobulinas possam estar relacionadas com o estado clínico dos indivíduos chagásicos (BRODSKYN & BARRAL-NETTO, 2000; LORCA et al., 1992). De fato, as imunoglobulinas presentes na infecção chagásica desempenham vários papéis, tanto na resistência do hospedeiro contra o parasita (GONZÁLEZ et al., 1996; KRETTLI & BRENER, 1976; 1982), como causando danos teciduais e modulando a fisiologia dos órgãos acometidos (HERNÁNDEZ et al., 2003; STERIN-BORDA et al., 2005).

O predomínio dos isotipos IgG1 e IgG3, identificados para os Ags-Recs CRA e FRA, também foi verificado em respostas imunes humorais identificadas para antígenos brutos (CERBAN et al., 1993; MORGAN et al., 1996), vivos (CORDEIRO et al., 2001) e até mesmo purificados de *T. cruzi*, como PFR (*Paraflagellar Rod Proteins*) (MICHAILOWSKY et al., 2003). Entretanto, outros trabalhos revelam diferentes isotipos predominantes frente a antígenos brutos, onde se destaca a presença de IgG1 e IgG2 (HERNÁNDEZ-BECERRIL et al., 2001) e frente a frações purificadas do parasito, onde o isotipo IgG1 predomina frente às demais subclasses de IgG (CERBAN et al., 1993).

Sabe-se que, frente a parasitas vivos, estes isotipos são capazes de ativar o sistema complemento, contribuindo na resistência do hospedeiro contra infecção (KRETTLI; BRENER, 1976, 1982; CORDEIRO et al., 2001). Foi mostrado que o isotipo IgG1 lítico estava presente em altos níveis em pacientes assintomáticos,

podendo ser utilizado para predizer o risco de dano cardíaco na doença de Chagas (CORDEIRO et al., 2001). Um outro estudo, realizado por Romeiro et al. (1984) também mostrou que o isotipo IgG2 apresenta atividade lítica.

Alguns trabalhos já evidenciaram uma resposta imune humoral mais intensa em pacientes que apresentam as formas severas da doença de Chagas em relação àqueles que são assintomáticos ou que apresentam cardiomiopatia leve (GUSMÃO et al., 1982; ZAUZA & BORGES-PEREIRA, 2001). Entretanto, não ficou evidenciado os isotipos que poderiam estar envolvidos na imunopatologia dessas formas severas.

Após a identificação das subclasses de IgG envolvidas na resposta imune humoral específica para os Ags-Recs CRA e FRA, gerada por pacientes chagásicos portadores das manifestações clínicas da doença de Chagas, e de verificarmos quais os isotipos que são capazes de discriminar os pacientes chagásicos dos indivíduos NC, selecionamos aqueles que poderiam ser utilizados como marcadores de evolução clínica da doença de Chagas. Posteriormente fizemos correlações entre a detecção de cada subclasse de IgG e as formas clínicas CARD, MIS e IND.

Através dos nossos resultados, pudemos perceber que há uma diversidade de respostas imune humoral frente aos Ags-Recs CRA ou FRA nos pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas. Entretanto, apenas o isotipo IgG2 específico para o Ag-Rec FRA foi capaz de discriminar pacientes chagásicos portadores da forma CARD dos pacientes portadores da forma IND, visto que os índices de reatividade deste isotipo foram significativamente superiores nos pacientes que apresentaram a forma CARD ($p= 0,010$).

Elevados níveis deste isotipo foram encontrados em um grupo de indivíduos chagásicos, pertencentes a uma comunidade ameríndia chamada Toba, em

comparação a outro grupo de indivíduos chagásicos, pertencentes à comunidade ameríndia chamada Mataco, esta última apresentando maior frequência de anormalidades eletrocardiográficas (MOTRAN et al., 1994). Outros estudos encontraram elevados níveis deste isotipo em pacientes portadores das formas CARD e MIS, quando comparados aos níveis deste isotipo nos indivíduos NC (MORGAN et al., 1996). Entretanto, os vários achados da literatura pesquisada não revelam a capacidade de discriminação de pacientes chagásicos que apresentem diferentes manifestações clínicas, provenientes de diferentes regiões endêmicas da doença de Chagas, utilizando-se tanto antígenos brutos (MORGAN et al., 1996), vivos (CORDEIRO et al., 2001) e purificados de *T. cruzi* (MICHAILOWSKY et al., 2003; MOTRAN et al., 1994) através do isotipo IgG2. Apenas um estudo, realizado por Hernández-Becerril et al. (2001), revela elevados níveis deste isotipo associados à cardiomegalia. Porém, não ficou estabelecida a possibilidade monitoramento de evolução clínica através deste isotipo, visto que não houve grupo de indivíduos chagásicos portadores da forma IND para comparação neste estudo.

A hipótese de que a utilização de antígenos purificados, em substituição aos antígenos brutos de *T. cruzi*, poderia revelar respostas isotípicas interessantes (MOTRAN et al., 1994; LORCA et al., 1992) foi, neste estudo, confirmada. A natureza antigênica do Ag-Rec FRA proporcionou a diferenciação dos pacientes que apresentam a forma CARD da doença de Chagas daqueles que são considerados assintomáticos através do isotipo IgG2. Entretanto, a relevância da presença deste isotipo na imunopatologia da cardiomiopatia chagásica ainda não é conhecida.

Este marcador, após ser avaliado num estudo prospectivo, poderia ser uma ferramenta a mais na identificação de pacientes chagásicos assintomáticos com

potencial evolutivo para a forma CARD. O médico, ao identificar a possibilidade de progressão da doença, redirecionaria a conduta do tratamento de seu paciente.

Os isotipos IgG1 e IgG3 específicos para os Ags-Recs CRA ou FRA, que também foram selecionados como potenciais marcadores de evolução clínica, apresentaram níveis elevados nos pacientes chagásicos como um todo, independente da forma clínica apresentada por eles. Como os métodos propedêuticos atualmente utilizados na determinação da forma clínica IND não são sensíveis, pacientes com alterações cardíacas leves podem estar sendo agrupados junto com os pacientes que apresentam a forma IND (DUTRA et al., 2005) e, assim, a resposta humoral uniforme nas formas CARD e IND impossibilitou a diferenciação destas através dos isotipos utilizados.

Em virtude dos vários estudos já publicados mostrando as funções protetoras (KRETTLI & BRENER, 1976, 1982) e agressoras (HERNÁNDEZ et al., 2003; STERIN-BORDA et al., 2005) dos anticorpos na infecção chagásica, os diferentes isotipos produzidos durante a infecção podem ter importante significado na imunopatologia da doença de Chagas, no que se refere à sua presença nas diferentes manifestações clínicas (LORCA et al., 1992). Assim, a discriminação de pacientes que manifestam apenas alterações cardíacas daqueles que manifestam alterações cardíacas e digestivas simultaneamente, através de uma resposta imune humoral, seria difícil devido ao componente cardíaco presente em ambos os grupos de pacientes. A inclusão de pacientes chagásicos portadores da forma DIG seria útil para confirmação desta hipótese.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Os índices de reatividade dos isotipos de IgG não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os pacientes chagásicos portadores das formas CARD, MIS e IND quando o Ag-Rec CRA foi utilizado. Estes resultados sugerem que esses isotipos não poderão servir como marcadores de evolução de prognóstico dessas formas clínicas utilizando o Ag-Rec CRA;
 2. Os isotipos IgG1, IgG3 e IgG4 específicos para o Ag-Rec FRA não poderão ser utilizados como marcadores de prognóstico de evolução das formas clínicas CARD, MIS e IND. Além disso, os índices de reatividade do isotipo IgG2 não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando foram comparados entre os pacientes chagásicos portadores das formas CARD e MIS, e entre os portadores das formas MIS e IND. Estes resultados sugerem que esses isotipos não poderão servir como marcadores de evolução de prognóstico dessas formas clínicas utilizando o Ag-Rec FRA;
 3. O isotipo IgG2 foi capaz de diferenciar indivíduos chagásicos portadores da forma CARD daqueles portadores da forma IND quando o Ag-Rec FRA foi utilizado. Este resultado indica que o isotipo IgG2 poderá servir como marcador de evolução clínica para forma CARD.
-

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

1. Realizar um estudo prospectivo para verificar se os indivíduos portadores da forma IND analisados no presente estudo, caso evoluam para a forma CARD, apresentam o marcador IgG2;
 2. Analisar o perfil isotípico das IgG em pacientes chagásicos provenientes das áreas endêmicas de Minas Gerais, Bahia, Goiás e Piauí onde circulam cepas de *T. cruzi* de diferentes biotemas;
 3. Realizar um estudo prospectivo nas áreas endêmicas acima citadas, caso seja definido um marcador de evolução clínica;
 4. Selecionar pacientes chagásicos portadores da forma DIG para fazerem parte das futuras pesquisas;
 5. Incluir em todas as análises a pesquisa das imunoglobulinas do tipo A e M.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, Suppl. I, p. 71-80, Jan. 1999.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benzonidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 63, n. 4, p. 721-726, 1985.

AVILA, J. L.; ROJAS, M.; GALILI, U. Immunogenic Gal alpha1----3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American *Trypanosoma* and Leishmania. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 142, n. 8, p. 2828-2834, Apr. 1989.

AZNAR, C. et al. Prevalence of anti R-13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 12, n. 3-4, p. 231-238, Dec. 1995.

BRODSKY, C. I.; BARRAL-NETTO, M. Resposta Imune na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. (Org.). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 10, p. 170-176.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, suppl. I, p. 331-335, Sept. 1999.

_____. Tratamento específico. In: CANÇADO, J. R.; CHUSTER, M. **Cardiopatia Chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, 1985.

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**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 227-233, out./dez. 1994.

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

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

DUSCHAK, V. G. et al. Humoral immune response to cruzipain and cardiac dysfunction in chronic Chagas' disease. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 135-142, Oct. 2001.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O. C.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 581-587, Dec. 2005.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 43 p.

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

GALILI, U. et al. Interaction between human natural anti α -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 56, n. 7, p. 1730-1737, Jul. 1988.

GAZZINELLI, R. T. et al. Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote-shed antigens to assess cure for human Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 49, n. 5, p. 625-635, Nov. 1993.

_____. Two models of idiotypic stimulation of T lymphocytes from patients with Chagas' disease: correlations with clinical forms of infection. **Research in Immunology**, Amsterdam, v. 141, n. 8, p. 757-770, Oct. 1990.

_____. Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 9, p. 1795-1800, Sep. 1988.

GAZZINELLI, G.; BRENER, Z. Immunological aspects of the morbidity of human Chagas' disease. **Research in Immunology**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 167-169, Feb. 1991.

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

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

_____. Isolement, caracterisation et propriete immunisante d'une proteine (72kDa) ubiquitaire du cycle evolutif de *Trypanosoma cruzi*. TESE, Paris, 1993.

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

GONZÁLEZ, J. et al. Serum antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in Atacameños patients from highland of northern Chile. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 60, n. 4, p. 225-236, Feb. 1996.

GUSMÃO, R. D'A. et al. Antibody levels to *Trypanosoma cruzi* in infected patients with and without evidence of chronic Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 31, n. 3, p. 452-458, May 1982.

HERNÁNDEZ, C. C. Q. et al. Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca²⁺ currents. **Cardiovascular Research**, London, v. 58, n. 1, p. 55-65, Apr. 2003.

HERNÁNDEZ-BECERRIL, N. et al. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. **Archivos de Cradiologia de Mexico**, Mexico, v. 71, n. 3, p. 199-205, Jul.-Sept. 2001.

HUGGINS, D. W.; MALTA, J.; MEDEIROS, L. B. Quadro Clínico: Fase Aguda. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. cap. IV, p. 39-42.

JANN, B.; RESKE, K.; JANN, K. Heterogeneity of lipopolysaccharides. Analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 239-246, Dec. 1975.

JARDIM, E. Quadro Clínico: Fase Crônica – Forma Nervosa. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. cap. IV, p. 58-70.

KEMENY, D. M. Tritation of antibodies. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 150, p. 57-76, June 1992.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 128, n. 5, p. 2009-2012, May 1982.

_____. Protective effect of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 116, n. 3, p. 755-760, Mar. 1976.

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

_____. Expression and polymorfism of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen. **Experimental Parasitology**, New York, v. 70, n. 3, p. 247-254, Apr. 1990.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Basingstoke, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

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

LAGES-SILVA, E. et al. Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 21-30, Jan. 1987.

LAUCELLA, S. A.; TITTO, E.; SEGURA, E. L. Epitopes common to *Trypanosoma cruzi* and mammalian tissues are recognized by sera from Chagas' disease patients:

prognosis value in Chagas' disease. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 151-162, Dec. 1996.

LIMA-MARTINS, M. V. et al. Antidody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 367-376, Jul. 1985.

LORCA, M. et al. Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 44-49, Jan. 1992.

MACÊDO, V. Indeterminate form of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, Suppl. I, p. 311-316, Jan. 1999.

MAGNANI, M. A. C.; FERRIOLLI, F.; SIQUEIRA, A. F. Imunoglobulinas específicas (IgA, IgG e IgM) em soros de chagásicos crônicos verificadas por reações de imunofluorescência indireta. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 72-75, mar./abr. 1973.

MALTA, J. Quadro Clínico: Fase Crônica – Forma Cardíaca. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. cap. IV, p. 70-79.

MARIN-NETO, J. A. et al. Forma indeterminada da moléstia de Chagas. Proposta de novos critérios de caracterização e perspectivas de tratamento precoce da cardiomiopatia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 79, n. 6, p. 623-627, Dec. 2002.

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

MILANI, S. R.; TRAVASSOS, L. R. Anti- α -galactosyl antibodies in chagasic patients. Possible biological significance. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 1275-1286, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, suppl. III, 29p., 2005.

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

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

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gel: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 117, n.2, p. 307-310, Nov.1981.

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

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

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

_____. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. **Parasitology**, London, v. 129, n. 5, p. 563-70, Nov. 2004.

_____. Antibody isotype responses in Balb/c mice immunized with the cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 823-825, Sept. 2003a.

_____. Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57BL/6 mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 435-440, jul./ago. 2003b.

_____. Os antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* como marcadores de evolução de formas clínicas. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 18., 2002, Uberaba. **Resumos...** Uberaba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2002. p. 27.

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

POWELL, M. R.; WASSOM, D. L. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. I. Antibody isotype profiles. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 215-221, Apr. 1993.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 1, n. 2, p. 92-100, Sept. 2001.

PRIMAVERA, K. S. C. et al. Chagas' disease: IgA, IgM e IgG antibodies to *Trypanosoma cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 172-180, maio/jun. 1990.

_____. Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 26, n. 10, p. 2101-2104, Oct. 1988.

REINA-SAN-MARTÍN, B.; COSSON, A.; MINOPRIO, P. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 62-67, Feb. 2000.

REIS, D. A. et al. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas' disease. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 150, n. 4, p. 1611-1618, Feb. 1993.

RIBEIRO-RODRIGUES, R. et al. Antibodies reactive to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes or amastigotes express different idiotypic patterns if from patients with different clinical forms of Chagas' disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 43, n. 6, p. 671-679, June 1996.

ROMEIRO, S. A.; TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' disease patients. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 413-418, Feb 1984.

SILVA, E. D. et al. Use of the EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 16, n. 3, p. 132-136, 2002.

SONG, E. S. et al. Rat and human natural killers exhibit contrasting immunoglobulin G subclass specificities in antibody-dependent cellular cytotoxicity reflecting differences in their Fc receptors (FcγR). **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 48, n. 6, p. 524-530, Dec. 1990.

STERIN-BORDA, L. et al. Interaction of human chagasic IgG with human colon muscarinic acetylcholine receptor: molecular and functional evidence. **Gut**, London, v. 49, n. 5, p. 699-705, Nov. 2001.

TOWBIN, H. et al. Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas' disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl (α 1→ 3) galactose epitopes. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 166, n. 2, p. 419-432, Aug. 1987.

UMEZAWA, E. S.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M. S. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 10, n. 6, p. 407-413, 1996.

VASCONCELOS, D. Quadro Clínico: Fase Crônica – Forma Digestiva. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. São Paulo: Sarvier, 1996. cap. IV, p. 48-58.

VENKATESAN, P.; WAKELIN, D. ELISAs for Parasitologists: or Lies, Damned Lies and ELISAs. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 9, n. 6, p. 228-232, June 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease: multi-governmental strategies. Disponível em: <<http://www.who.int.tdr.research.progress9900/partnership/chagas.html>>. Acesso em: 22 jul. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease: Strategic direction for research. Disponível em: <<http://www.who.int.tdr.diseases/chagas/direction.html>>. Acesso em: 24 out. 2005.

ZAUZA, P.L.; BORGES-PERERIRA, J. Níveis séricos de IgG anti-*T. cruzi* na evolução da cardiopatia chagásica, no período de 10 anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 5, p. 399-405, set./out. 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Resolução 196/96

Projeto: “Caracterização do Perfil Isotópico das Imunoglobulinas de Indivíduos Chagásicos Frente aos Antígenos Recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi*”.

Eu, _____, RG _____, aceito participar desse estudo, cujo objetivo é avaliar o padrão de anticorpos no soro de pessoas portadoras da doença de Chagas com forma cardíaca, digestiva, mista e indeterminada. Para obtermos esse padrão o soro deve ser testado frente a duas proteínas (antígenos) que têm sido usadas no diagnóstico da doença de Chagas. Fui informado que eu terei meu sangue coletado para o teste e o mesmo será utilizado no estudo acima referido. Fui orientado em relação aos benefícios desse estudo, que visa a detecção de um padrão que poderá ajudar no acompanhamento do tratamento da doença de Chagas. Fui informado ainda que o material coletado será incorporado ao Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, podendo ser utilizado em pesquisas posteriores onde os meus dados serão preservados em sigilo absoluto quando da publicação dos resultados. 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 deverei ficar com uma cópia do presente documento.

Contato: Dra. Yara Gomes – Departamento de Imunologia (CPqAM/Fiocruz)

Recife, _____ de _____ de _____.

Paciente, pai ou responsável

testemunha

Médico responsável

APÊNDICE B - Formulário de Pesquisa

PROJETO: "Avaliação dos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma cruzi* como marcadores das formas clínicas crônicas da doença de Chagas".

1. Nome: _____

Prontuário n°: _____ Registro CPqAM: _____

Data da coleta: _____

2. Sexo: (1) Feminino (2) Masculino

3. Idade: _____ (1) De 0 a 12 anos
(2) De 13 a 19 anos
(3) De 20 a 59 anos
(4) A partir de 60 anos
(9) IGN

4. Situação trabalhista: (1) Empregado
(2) Desempregado
(3) Aposentado
(4) Do lar
(9) IGN

Endereço: _____

Bairro: _____ Município: _____

Estado: _____ Telefone: (____) - _____ Celular: (____) - _____

5. Município de nascimento: _____ 6. Estado: _____

6. Forma de contaminação: (1) Vetorial
(2) Transfusional
(3) Congênita
(4) Oral
(5) Transplante de órgão
(6) Acidente de laboratório
(9) IGN

7. Exames clínicos convencionais:

RX coração: (1) normal (2) dilatação

ECG: (1) normal (2) anormal

RX esôfago (1) normal (2) dilatação

Enema opaco: (1) normal (2) dilatação

8. Sorologia:

IFI: (1) positivo (2) negativo

HAI: (1) positivo (2) negativo

ELISA: (1) positivo (2) negativo

9. Forma clínica crônica: (1) Forma cardíaca
(2) Forma digestiva
(3) Forma indeterminada
(4) Forma mista

10. Medicação: (1) Sim (2) Não

APÊNDICE C – ARTIGO EM PREPARAÇÃO

PESQUISA DE IMUNOGLOBULINAS G EM PACIENTES CHAGÁSICOS CRÔNICOS FRENTE AOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES *CYTOPLASMIC REPETITIVE ANTIGEN E FLAGELLAR REPETITIVE ANTIGEN* DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Verçosa AFA¹, Lorena VMB¹, Carvalho CL¹, Melo MFAD¹, Machado RCA¹,
Cavalcanti MGA², Silva ED³, Ferreira AGP³, Pereira VRA¹, Souza WV¹, Gomes YM¹

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/Fiocruz, Recife-PE, ²Hospital
Oswaldo Cruz – HUOC/Universidade de Pernambuco/UPE, Recife-PE, ³Bio-
Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ.

Correspondência para: Yara M. Gomes, Departamento de Imunologia, Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária,
50670-420, Recife, PE, Brazil. Fax: 55-81-34532449, Phone: 55-81-2101-2559.
email: yara@cpqam.fiocruz.br

RESUMO

Em virtude da magnitude da infecção, de sua elevada morbimortalidade, com destaque para a cardiopatia, além da quase ineficácia do tratamento etiológico, justificam-se estudos que visem à melhoria da qualidade de vida dos portadores da enfermidade de Chagas. A pesquisa das subclasses de IgG no soro de indivíduos chagásicos frente a dois antígenos específicos do *Trypanosoma cruzi* é o objetivo deste trabalho, visando a obtenção de um perfil isotípico que seja capaz de discriminar as formas clínicas cardíaca (CARD), mista (MIS) e indeterminada (IND). Verificamos que a resposta imune humoral gerada pelos pacientes frente aos Ags-Recs é bastante variada, com produção de quase todas as subclasses de IgG específicas nos grupos de formas clínicas analisados. Entretanto, apenas o isotipo

IgG2 específico para o Ag-Rec FRA foi capaz de diferenciar pacientes chagásicos portadores da forma CARD daqueles portadores da forma IND, podendo, após um estudo prospectivo, servir como marcador de evolução clínica com danos cardíacos. Esta informação é importante, uma vez que permite ao médico avaliar a possibilidade de redirecionar a conduta do tratamento de seu paciente.

Palavras-chave: Perfil isotípico; Antígenos recombinantes; Doença de Chagas

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma enfermidade de características clínicas peculiares. Os indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico desta enfermidade, podem apresentar, após um período variável de tempo, uma das quatro formas clínicas mais frequentes, que são a forma cardíaca (CARD), forma digestiva (DIG), forma mista (MIS) e forma indeterminada (IND).

Pouco ainda se conhece sobre os mecanismos imunes e patogênicos que estão envolvidos na transição da fase aguda para a crônica, bem como os fatores que favorecem o desenvolvimento de uma determinada forma clínica (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 1996). Vários estudos têm demonstrado que a heterogeneidade clínica observada entre os pacientes chagásicos está associada a uma distinta e complexa relação parasita-hospedeiro, com o envolvimento direto do sistema imune (ANDRADE, 1999; GAZZINELLI; BRENER, 1991; POWELL; WASSOM, 1993).

A enfermidade é circunscrita em 15 países endêmicos na América Latina, onde se estima uma prevalência de infecção humana em cerca de 18 milhões de casos e que cerca de 120 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção (WHO, 2002). Somando-se a isso, ainda não existe um medicamento eficaz para o tratamento e nenhuma vacina que previna a doença (CANÇADO, 1985).

Em virtude da magnitude da infecção, de sua elevada morbimortalidade, com destaque para a cardiopatia, que gera um grande impacto social e médico-trabalhista (MALTA, 1996; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005), além da quase ineficácia do tratamento etiológico, justificam-se estudos que visem à melhoria da qualidade de vida dos portadores da enfermidade de Chagas.

Com o intuito de tentar diferenciar os pacientes com potencial evolutivo, vários grupos de pesquisa tentam estabelecer marcadores biológicos de evolução do prognóstico da doença através de abordagens imunológicas. Alguns deles buscam por um padrão de imunoglobulinas associadas a um ou mais antígenos de *T. cruzi* que sejam capazes de diferenciar as formas clínicas e prever seu potencial evolutivo. É por meio desta abordagem que o presente trabalho vai estudar a resposta imune humoral estabelecida pelo indivíduo chagásico frente a dois antígenos recombinantes de *T. cruzi*, e relacionar esta resposta com as formas clínicas CARD, DIG, MIS e IND da doença de Chagas.

Para tal finalidade, serão utilizados dois antígenos específicos de *T. cruzi*, o CRA e o FRA, construídos através da tecnologia do DNA recombinante. Esses dois antígenos apresentam uma estrutura de epítomos repetitivos, e por este motivo o antígeno repetitivo que está localizado na região do flagelo recebeu o nome de FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*). Ele é encontrado nas formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*. Da mesma forma, o antígeno repetitivo que está localizado no citoplasma foi chamado de CRA (*Cytoplasmic Repetitive Antigen*), e está presente nas formas evolutivas epimastigota e amastigota do parasito (KRIEGER et al., 1992; LAFAILLE et al., 1989). A resposta imune frente a estes antígenos já foi extensivamente estudada experimentalmente (PEREIRA et al., 2003a, 2003b, 2004, 2005), e o potencial diagnóstico deles também já foi comprovado (GADELHA et al., 2003; GOMES et al., 2001). Não se conhece, porém que isotipos de IgG estão envolvidos na resposta imune humoral gerada por pacientes chagásicos frente a estes Ags-Recs.

A utilização de proteínas puras e quimicamente definidas e ainda, específicas do parasito, é sugerida por vários autores para fornecer maior especificidade aos resultados na identificação de moléculas alvo de uma interação parasita-hospedeiro bem sucedida, e para estudar a imunopatologia da doença de Chagas (CERBAN et al., 1993; LORCA et al., 1992; MOTRAN et al., 1994). Assim, com a utilização das proteínas CRA e FRA, poderíamos avaliar os resultados de respostas imunes específicas durante a fase crônica da doença de Chagas, estabelecendo um perfil isotípico que discriminasse as diferentes formas clínicas da doença.

METODOLOGIA

Análise da pureza dos Ags-Recs CRA e FRA

Os Ags-Recs CRA e FRA, obtidos como descrito por Krieger et al. (1992), e preparados no Laboratório de Reativos do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) da Fiocruz. A verificação da pureza e integridade dos Ags-Recs foi feita através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) através do método de método de Laemmli (1970), seguida de colorações específicas para proteínas (MORRISEY, 1981) e carboidratos (JANN, et al., 1975).

População do estudo

Os pacientes chagásicos foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE), ambos situados na cidade de Recife-PE. Os indivíduos sadios foram selecionados na cidade de Recife-PE.

Os pacientes chagásicos foram submetidos a exames clínico-laboratoriais que compreendiam: exame físico, raios X contrastado de esôfago, raios X de tórax, eletrocardiograma e sorologia para infecção pelo *T. cruzi*.

Foram categorizados como pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica aqueles que apresentaram alguma alteração no eletrocardiograma e/ou dilatação do coração, com ausência de dilatação do esôfago e/ou sem sintomatologia digestiva alta e baixa, e apresentando sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*.

Foram categorizados como pacientes portadores da forma MIS, aqueles que, além das evidências encontradas para os portadores da cardiopatia chagásica crônica, também apresentaram megaesôfago e/ou megacólon, tratados cirurgicamente ou não, e apresentando sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*.

Foram categorizados como pacientes portadores da forma IND aqueles que não apresentaram nenhuma das alterações descritas para a forma CARD e MIS, e apresentando sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi*.

Foram considerados indivíduos saudáveis aqueles que apresentaram sorologia negativa para infecção pelo *T. cruzi* em dois testes sorológicos, nunca receberam transfusão de sangue e nem habitaram em área endêmica.

De acordo com os critérios acima estabelecidos, o sangue foi coletado de 60 pacientes chagásicos, dos quais 33 apresentavam a forma CARD, 7 a forma MIS e 20 a forma IND. Também foi coletado sangue de 40 indivíduos saudáveis, dos quais 20 foram utilizados como grupo de indivíduos não-chagásicos (NC) para comparação com os grupos de indivíduos chagásicos, e os outros 20 foram utilizados para estabelecimento do ponto de corte ou *cut-off* (CO).

Aspectos éticos

Os pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis envolvidos neste estudo tiveram participação voluntária, assinando o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e responderam a um formulário de pesquisa. A conduta de inclusão dos mesmos e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM/Fiocruz.

Determinação do perfil isotípico contra os Ags-Recs CRA ou FRA

Placas de ELISA (Nunc-Immuno Plates, MaxiSorp, 96 poços, Nalge Nunc International Corporation) foram sensibilizadas com os Ags-Recs CRA ou FRA nas concentrações de 5 e 2,5µg/mL (100µL/poço), respectivamente, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 e incubadas “overnight” a 4°C. Após lavagens e bloqueio dos sítios inespecíficos com 200µL de PBS-Tween 20 a 0,05% contendo 1% de albumina bovina sérica (BSA) (SIGMA, St. Louis, MO), os soros foram diluídos em PBS-Tw a 1:100 e 100µL e foram depositados em duplicata nos poços, sendo posteriormente incubados “overnight” a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e a ligação dos anticorpos específicos foi detectada pela incubação (TA durante 1h30min) de 100µL dos anti-isotipos (anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4) conjugados à biotina (SIGMA, St. Louis, MO), diluídos em PBS-Tw contendo 0,1% de BSA nas diluições previamente estabelecidas, e incubadas à TA durante 1h30min. Após nova lavagem, as placas foram incubadas à TA durante 1h com 100µL estreptavidina conjugada à peroxidase (Pharmingen, San Jose, CA), diluída em PBS-Tw a 1:3000. A reação foi revelada pela adição de ortofenilenodiamina

(0,01%) (SIGMA, St. Louis, MO) mais H₂O₂ (0,01%) (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), diluídos em tampão citrato-fosfato, pH 5,0. A quantificação da reação foi determinada através do leitor de ELISA (BIO-RAD 3550) a 490 nm.

O CO foi estabelecido para cada placa calculando-se a média das DOs dos indivíduos saudáveis adicionada de dois desvios-padrão. Os resultados foram expressos na forma de índice, onde os valores das médias das DOs das amostras foram divididas pelo CO de sua respectiva placa, a fim de tornar comparáveis os resultados das diferentes placas.

Análise estatística

Foi utilizado o programa SPSS versão 8 (*Statistical Package for Social Sciences Incorporation*, US) para análise dos resultados. O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar se os índices calculados para cada isotipo apresentavam distribuição normal. Os testes não-paramétricos Mann-Whitney e Wilcoxon foram utilizados para avaliar as diferenças entre os índices calculados para cada amostra.

Os gráficos foram construídos utilizando-se o programa *Graphpad Prism* versão 3.0. A diferença entre os resultados obtidos foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Frente ao Ag-Rec CRA, o isotipo IgG1 foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos portadores das formas CARD, MIS e IND dos indivíduos NC, visto que seus índices de reatividade foram significativamente superiores aos dos indivíduos NC. Entretanto, não houve diferença significativa entre os índices de reatividade, para este isotipo, entre os pacientes portadores da forma CARD, MIS e IND (Figura 1A).

Com relação ao isotipo IgG2, apenas pacientes portadores da forma CARD puderam ser diferenciados dos indivíduos NC através deste isotipo. Entretanto, estes pacientes chagásicos não puderam ser diferenciados dos pacientes portadores das formas MIS e IND, visto que a reatividade para este isotipo não apresentou diferença estatisticamente significativa entre estes grupos de indivíduos chagásicos (Figura 1B).

Apesar do isotipo IgG3 poder diferenciar pacientes chagásicos, portadores das formas CARD e MIS, dos indivíduos NC, os índices de reatividade deste isotipo não apresentaram diferença entre estas duas formas clínicas. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os índices de reatividade, para este isotipo, entre os pacientes portadores da forma CARD ou MIS e os pacientes portadores da forma IND (Figura 1C).

Como o isotipo IgG4 não foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos com diferentes manifestações clínicas dos indivíduos NC (dados não mostrados), não selecionamos este isotipo para diferenciar os pacientes chagásicos participantes do estudo.

Frente ao Ag-Rec FRA, o isotipo IgG1 foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos portadores das formas CARD, MIS e IND dos indivíduos NC. Entretanto, não houve diferença significativa entre os índices de reatividade, para este isotipo, entre os pacientes portadores da forma CARD, MIS e IND (Figura 2A).

Com relação ao isotipo IgG2, vimos que todos os pacientes chagásicos portadores das diferentes manifestações clínicas puderam ser diferenciados dos indivíduos NC através deste isotipo. Este isotipo também foi capaz de diferenciar pacientes chagásicos portadores das formas CARD e IND, visto que os índices de reatividade do primeiro grupo de pacientes foram significativamente superiores aos do segundo grupo ($p= 0,010$). Pacientes portadores da forma MIS não puderam ser diferenciados, através deste isotipo, dos pacientes portadores das formas CARD e IND (Figura 2B).

Apesar de o isotipo IgG3 poder diferenciar pacientes chagásicos portadores das formas CARD, MIS e IND dos indivíduos NC, este isotipo não foi capaz de diferenciar as diferentes formas clínicas da doença de Chagas (Figura 2C).

Situação semelhante ocorreu com o isotipo IgG4, que foi capaz de diferenciar os pacientes chagásicos portadores das formas CARD e IND dos indivíduos NC, porém não foi capaz de diferenciar os pacientes portadores destas formas, e nem diferenciá-los dos pacientes portadores da forma MIS (Figura 2D).

DISCUSSÃO

A pesquisa de imunoglobulinas específicas no soro de indivíduos chagásicos, juntamente com a utilização de antígenos puros e específicos, poderia formar um

conjunto chave para a elucidação de alguns fatores que estariam envolvidos na indução e manutenção das manifestações clínicas da doença (CERBAN et al., 1993; LORCA et al., 1992; MOTRAN et al., 1994). Adicionalmente, poderíamos obter importantes informações que pudessem contribuir para a busca de um marcador de evolução de prognóstico das formas clínicas da doença de Chagas.

Os Ags-Recs CRA e FRA, proteínas específicas do *T. cruzi*, foram utilizados neste estudo com o objetivo de evidenciar uma associação entre a resposta imune humoral específica gerada por pacientes chagásicos e o estado clínico destes pacientes. A metodologia de ELISA foi a escolhida por já ser bem estabelecida há três décadas, além de ser de fácil execução (KEMENY, 1992).

Através dos ELISAs realizados pudemos confirmar que os pacientes chagásicos desenvolvem uma resposta imune humoral frente aos Ags-Recs CRA e FRA. Entretanto, os vários trabalhos publicados apenas revelam o potencial diagnóstico destes Ags-Recs sem, contudo, identificar as subclasses de IgG que predominam nas respostas imunes identificadas (GADELHA et al., 2003; GOLDENBERG et al., 1991; GOMES et al., 2001; SILVA et al., 2002).

Nos pacientes chagásicos que selecionamos, as respostas imunes geradas foram bastante diversificadas com relação às subclasses de IgG produzidas e às formas clínicas nas quais elas estavam presentes, tanto para o Ag-Rec CRA como para o Ag-Rec FRA. Estas respostas foram constituídas principalmente pelos isotipos IgG1 e IgG3, podendo estes diferenciar a maioria dos pacientes chagásicos dos indivíduos NC. Também estavam presentes os isotipos IgG2 e IgG4, porém com menor magnitude, além de menor capacidade de discriminação entre indivíduos infectados e os não infectados.

A diversidade de respostas encontrada nas formas clínicas nos leva a crer que as imunoglobulinas possam estar relacionadas com o estado clínico dos indivíduos chagásicos (BRODSKYN; BARRAL-NETTO, 2000; LORCA et al., 1992). De fato, as imunoglobulinas presentes na infecção chagásica desempenham vários papéis, tanto na resistência do hospedeiro contra o parasita (GONZÁLEZ et al., 1996; KRETTLI; BRENER, 1976, 1982), como causando danos teciduais e modulando a fisiologia dos órgãos acometidos (HERNÁNDEZ et al., 2003; STERIN-BORDA et al., 2005).

O predomínio dos isotipos IgG1 e IgG3 identificados para os Ags-Recs CRA e FRA não se diferencia das respostas imunes humorais identificadas para antígenos

brutos fixados (MORGAN et al., 1996), vivos (CORDEIRO et al., 2001) e até mesmo purificados de *T. cruzi* (MICHAILOWSKY et al., 2003). Sabe-se que, frente a parasitas vivos, estes isotipos são capazes de ativar o sistema complemento, contribuindo na resistência do hospedeiro contra infecção (KRETTLI; BRENER, 1976, 1982; CORDEIRO et al., 2001). Foi mostrado que o isotipo IgG1 lítico estava presente em altos níveis em pacientes assintomáticos, podendo ser utilizado para prever o risco de dano cardíaco na doença de Chagas (CORDEIRO et al., 2001). Um outro estudo, realizado por Romeiro et al. (1984) também mostrou que o isotipo IgG2 também apresenta atividade lítica.

Alguns trabalhos já evidenciaram uma resposta imune humoral mais intensa em pacientes que apresentam as formas severas da doença de Chagas em relação àqueles que são assintomáticos ou que apresentam cardiomiopatia leve (GUSMÃO et al., 1982; ZAUZA; BORGES-PEREIRA, 2001). Entretanto, não ficou evidenciado os isotipos que poderiam estar envolvidos na imunopatologia dessas formas severas.

Através dos nossos resultados, pudemos perceber que há uma diversidade de respostas imune humoral frente aos Ags-Recs CRA ou FRA. Entretanto, apenas o isotipo IgG2 específico para o Ag-Rec FRA foi capaz de discriminar pacientes chagásicos portadores da forma CARD dos pacientes portadores da forma IND, visto que os índices de reatividade deste isotipo foram significativamente superiores nos pacientes que apresentaram a forma CARD ($p= 0,010$).

Elevados níveis deste isotipo foram encontrados em um grupo de indivíduos chagásicos que eram geneticamente diferentes de um outro grupo, que apresentavam maior frequência de anormalidades eletrocariográficas (MOTRAN et al., 1994). Também encontraram elevados níveis deste isotipo em pacientes portadores das formas CARD e MIS, quando comparados aos níveis nos indivíduos NC (MORGAN et al., 1996). Entretanto, não há relatos na literatura pesquisada sobre a capacidade de discriminação de pacientes chagásicos que apresentem diferentes manifestações clínicas, provenientes de diferentes regiões endêmicas da doença de Chagas, utilizando-se tanto antígenos brutos (MORGAN et al., 1996) como purificados de *T. cruzi* (MICHAILOWSKY et al., 2003; MOTRAN et al., 1994) através do isotipo IgG2.

A hipótese de que a utilização de antígenos purificados, em substituição aos antígenos brutos de *T. cruzi*, poderia revelar respostas isotípicas interessantes

(MOTRAN et al., 1994; LORCA et al., 1992) foi, neste estudo, confirmada. A natureza antigênica do Ag-Rec FRA proporcionou a diferenciação dos pacientes que apresentam a forma CARD da doença de Chagas daqueles que são considerados assintomáticos através do isotipo IgG2. Entretanto, a relevância da presença deste isotipo na imunopatologia da cardiomiopatia chagásica ainda não é conhecida.

Este marcador, após ser avaliado num estudo prospectivo, poderia ser uma ferramenta a mais na identificação de pacientes chagásicos assintomáticos com potencial evolutivo para a forma CARD. O médico, ao identificar a possibilidade de progressão da doença, redirecionaria a conduta do tratamento de seu paciente.

Os isotipos IgG1 e IgG3 específicos para os Ags-Recs CRA ou FRA, que também foram selecionados como potenciais marcadores de evolução clínica, apresentaram níveis elevados nos pacientes chagásicos como um todo, independente da forma clínica apresentada por eles. Como os métodos propedêuticos atualmente utilizados na determinação da forma clínica IND não são sensíveis, pacientes com alterações cardíacas leves podem estar sendo agrupados junto com os pacientes que apresentam a forma IND (DUTRA et al., 2005) e, assim, a resposta humoral uniforme nas formas CARD e IND impossibilitou a diferenciação destas através dos isotipos utilizados.

Em virtude dos vários estudos já publicados mostrando as funções protetoras (KRETTLI; BRENER, 1976, 1982) e agressoras (GAZZINELLI et al., 1990; HERNÁNDEZ et al., 2003; STERIN-BORDA et al., 2005) dos anticorpos na infecção chagásica, os diferentes isotipos produzidos durante a infecção podem ter importante significado na imunopatologia da doença de Chagas, no que se refere à sua presença nas diferentes manifestações clínicas (LORCA et al., 1992). Assim, a discriminação de pacientes que manifestam apenas alterações cardíacas daqueles que manifestam alterações cardíacas e digestivas simultaneamente, a forma mista, através de uma resposta imune humoral, seria difícil devido ao componente cardíaco presente em ambos os grupos de pacientes.

Agradecimentos

Nós agradecemos a Mineo Nakazawa pela sua excelente assistência técnica, a Carlos Luna, Ulisses Montarroyos, Vanessa e Alessandro pela assistência na análise estatística, e as Dras. Cristina Tavares, Marisa Melo e Sílvia, e ao Dr. Jarbas Malta

pela seleção de alguns pacientes chagásicos que participaram deste estudo. Este trabalho foi financiado por Biomanguinhos/Fiocruz, (grant N° ...), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPEs. Yara M. Gomes é pesquisadora do CNPq, Camila L. Carvalho, Myllena F. A. D. Melo e Raquel C. A. Machado são bolsistas do PIBIC/Fiocruz, Alinne F. A. Verçosa e Virginia M. B. Lorena são bolsistas da CAPEs e cursam o mestrado de Saúde Pública do CPqAM/Fiocruz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas` disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, Suppl. I, p. 71-80, Jan. 1999.

BRODSKY, C. I.; BARRAL-NETTO, M. Resposta Imune na Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. (Org.). **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 10, p. 170-176.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico. In: CANÇADO, J. R.; CHUSTER, M. **Cardiopatia Chagásica**, Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas. 1985.

CERBAN, F. M.; GEA, S.; MENSIO, E.; VOTTERO-CIMA, E. Chagas` disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acid antigens in patients with different degrees of heat damage. **Clinical Immunology and Immunopathology**, Orlando, v. 67, n. 1, p. 25-30, Apr. 1993.

CORDEIRO, F. D.; MARTINS-FILHO, O.; ROCHA, M. O. C.; ADAD, S.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROMANHA, J. A. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin IgG1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas` disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, n. 1, p.112-118, Jan. 2001.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O. C.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 581-587, Dec. 2005.

GADELHA, A. A. M.; VERÇOSA, A. F. A.; LORENA, V. M. B.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G. P.; SOUZA, W. V.; CARVALHO, A. B.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; GOMES, Y. M. Chagas` disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and hemagglutination tests. **Vox Sanguinis**, Oxford, v. 85, n. 3, p. 165-170, Oct. 2003.

GAZZINELLI, G.; BRENER, Z. Immunological aspects of the morbidity of human Chagas' disease. **Research in Immunology**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 167-169, 1991.

GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A.; LAFAILLE, J. J.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W. Use of *Trypanosoma cruzi* antigens in the immunological diagnosis of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 71-76, 1991.

GOMES, Y. M.; PEREIRA, V. R. A.; NAKAZAWA, M.; ROSA, D. S.; BARROS, M. N. D. S.; FERREIRA, A. G. P.; SILVA, E. D.; OGATTA, S. F.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. Serodiagnosis of chronic Chagas' disease by using EIE-Recombinante-Chagas-Biomanguinhos kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 4, p. 497-501, May 2001.

GONZÁLEZ, J.; NEIRA, I.; GUTIÉRREZ, B.; ANACONA, D.; MANQUE, P.; SILVA, X.; MARÍN, S.; SUAGUA, H.; VERGARA, U. Serum antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in Atacameños patients from highland of northern Chile. **Acta Tropica**, v. 60, n., p. 225-236, 1996.

GUSMÃO, R. D'A.; REZENDE, J. M.; RASSI, A.; GAM, A. A.; NEVE, F. A. Antibody levels to *Trypanosoma cruzi* in infected patients with and without evidence of chronic Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 31, n. 3, p. 452-458, May 1982.

HERNÁNDEZ, C. C. Q.; BARCELLOS, L. C.; JIMÉNEZ, L. E. D.; CABARCAS, R. A. B.; GARCIA, S.; PEDROSA, R. C.; NASCIMENTO, J. H. M.; KURTENBACH, E.; MASUDA, M. O.; CARVALHO, A. C. C. Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca^{2+} currents. **Cardiovascular Research**, London, v. 58, n. 1, p. 55-65, Apr. 2003.

JANN, B.; RESKE, K.; JANN, K. Heterogeneity of lipopolysaccharides. Analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 239-246, 1975.

KEMENY, D. M. Tritation of antibodies. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 150, p. 57-76, June 1992.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Protective effect of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 116, n. 3, p. 755-760, Mar. 1976.

_____. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 128, n. 5, p. 2009-2012, May 1982.

KRIEGER, M. A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W.; LAFAILLE, J. J.; PEREIRA, J. B.; KRIEGER, H.; CARVALHO, M. R.; GOLDENBERG, S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 4, p. 427-434, Apr. 1992.

LAFAILLE, J. J.; LINSS, J.; KRIEGER, M. A.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 127-136, June 1989.

LORCA, M.; GONZALEZ, A.; VELOSO, C.; REYES, V. Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 44-49, Jan. 1992.

MALTA, J. Quadro Clínico: Fase Crônica – Forma Cardíaca. In: MALTA, J. (Org.). **Doença de Chagas**. 1ª ed. São Paulo: Sarvier, 1996. cap. IV, p. 70-79.

MICHAILOWSKY, V.; LUHRS, K.; ROCHA, M. O. C.; FOUTS, D.; GAZZINELLI, R. T.; MANNING, J. E. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived Paraflagellar Rod Proteins in patients with Chagas' disease. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 6, p. 3165-3171, June 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, suppl. III, 29p., 2005.

MORGAN, J.; DIAS, J. C. P.; GONTIJO, E. D.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLLEY, D. G.; POWELL, M. R. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 355-359, Oct. 1996.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gel: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 117, n.2, p. 307-310, Nov.1981.

MOTRAN, C. C.; SERRA, H. M.; GEA, S. E.; VULLO, C. M.; VOTTERO-CIMA, E. Antibody isotypes profiles against *Trypanosoma cruzi* antigens in two Ameridian populations from a Chagas' disease endemic area. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 105-114, Nov. 1994.

PEREIRA, V. R.; LORENA, V. M. B.; NAKAZAWA, M.; LUNA, C. F.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A.G.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; SOARES, M. B. P.; COUTINHO, E. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. M. Humoral and cellular immune responses in BALB/c and C57BL/6 mice immunized with cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens, in acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, Berlin, v. 96, n. 3, p. 154-161, Apr. 2005.

PEREIRA, V. R.; LORENA, V. M. B.; NAKAZAWA, M.; LUNA, C. F.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A.G.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; SOARES, M. B.; COUTINHO, E. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. M. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. **Parasitology**, London, v. 129, n. 5, p. 563-70, Nov. 2004.

PEREIRA, V. R.; LORENA, V. M. B.; VERÇOSA, A. F. A.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A.G.; MONTARROYOS, U.; SILVA, A. P. G.; GOMES, Y. M. Antibody isotype responses in Balb/c mice immunized with the cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 823-825, Sept. 2003a.

PEREIRA, V. R.; LORENA, V. M. B.; NAKAZAWA, M.; SILVA, A. P. G.; MONTARROYOS, U.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. M. Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57BL/6 mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 435-440, jul./ago. 2003b.

POWELL, M. R.; WASSOM, D. L. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. I. Antibody isotype profiles. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 215-221, Apr. 1993.

RIBEIRO-RODRIGUES, R.; COLLEY, D. G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARTER, C. E. Antibodies reactive to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes or amastigotes express different idiotypic patterns if from patients with different clinical forms of Chagas' disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 43, n. 6, p. 671-679, June 1996.

ROMEIRO, S. A.; TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' disease patients. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 413-418, Feb 1984.

SILVA, E. D.; PEREIRA, V. R. A.; GOMES, J. A. S.; LORENA, V. M. B.; CANÇADO, J. R.; FERREIRA, A. G. P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. M. Use of the EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 16, p. 132-136, 2002.

STERIN-BORDA, L.; GOIN, J. C.; BILDER, C. R.; IANTORNO, G.; HERNANDO, A. C.; BORDA, E. Interaction of human chagasic IgG with human colon muscarinic acetylcholine receptor: molecular and functional evidence. **Gut**, London, v. 49, p. 699-705, Nov. 2001.

WHO (World Health Organization), 2002. Chagas disease: Strategic direction for research. (www.who.int.tdr.diseases/chagas/direction.htm) [capturado em 24/10/2005].

ZAUZA, P.L.; BORGES-PERERIRA, J. Níveis séricos de IgG anti-*T. cruzi* na evolução da cardiopatia chagásica, no período de 10 anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 5, p. 399-405, set./out. 2001.

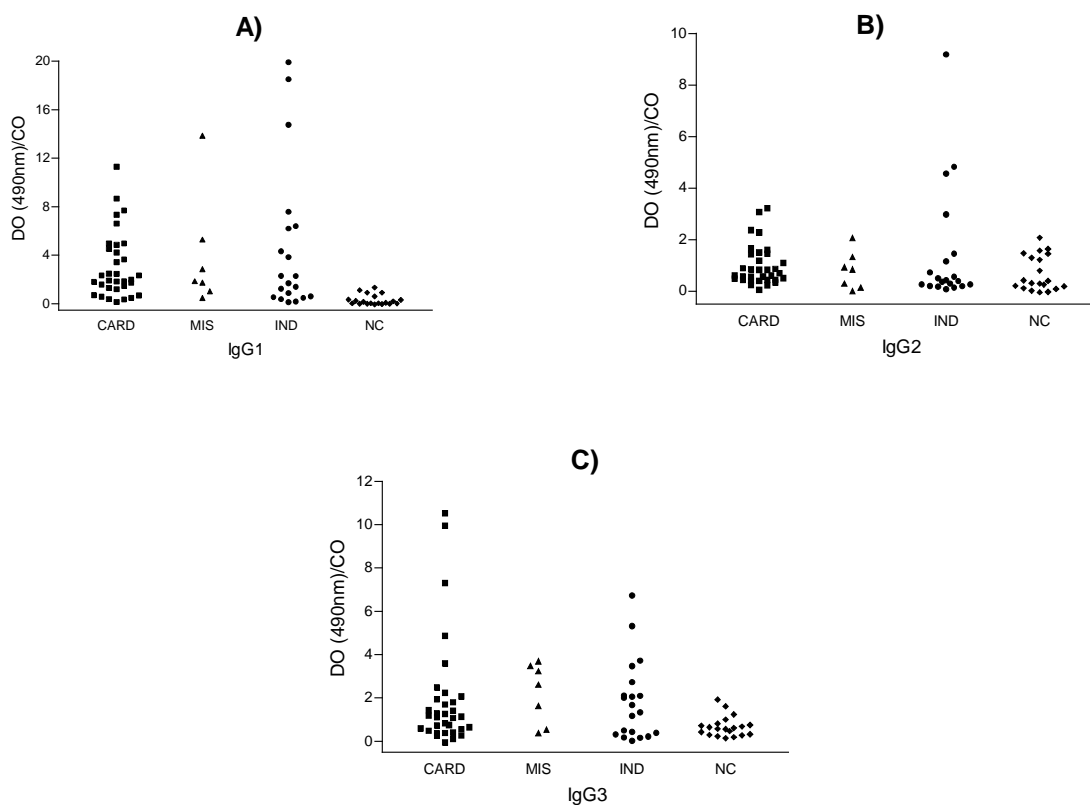


FIGURA 1 – Índices de reatividade dos isotipos IgG1, IgG2 e IgG3 de pacientes chagásicos crônicos portadores das formas CARD, MIS e IND, frente ao Ag-Rec CRA. O eixo das ordenadas apresenta os índices de reatividade, resultantes da divisão entre a média de densidade óptica de cada amostra pelo *cut-off*. Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra. CO= *cut-off*, DO= densidade óptica; CARD= forma cardíaca (n= 33); MIS= forma mista (n= 7); IND= forma indeterminada (n= 20) e NC= não-chagásico (n= 20).

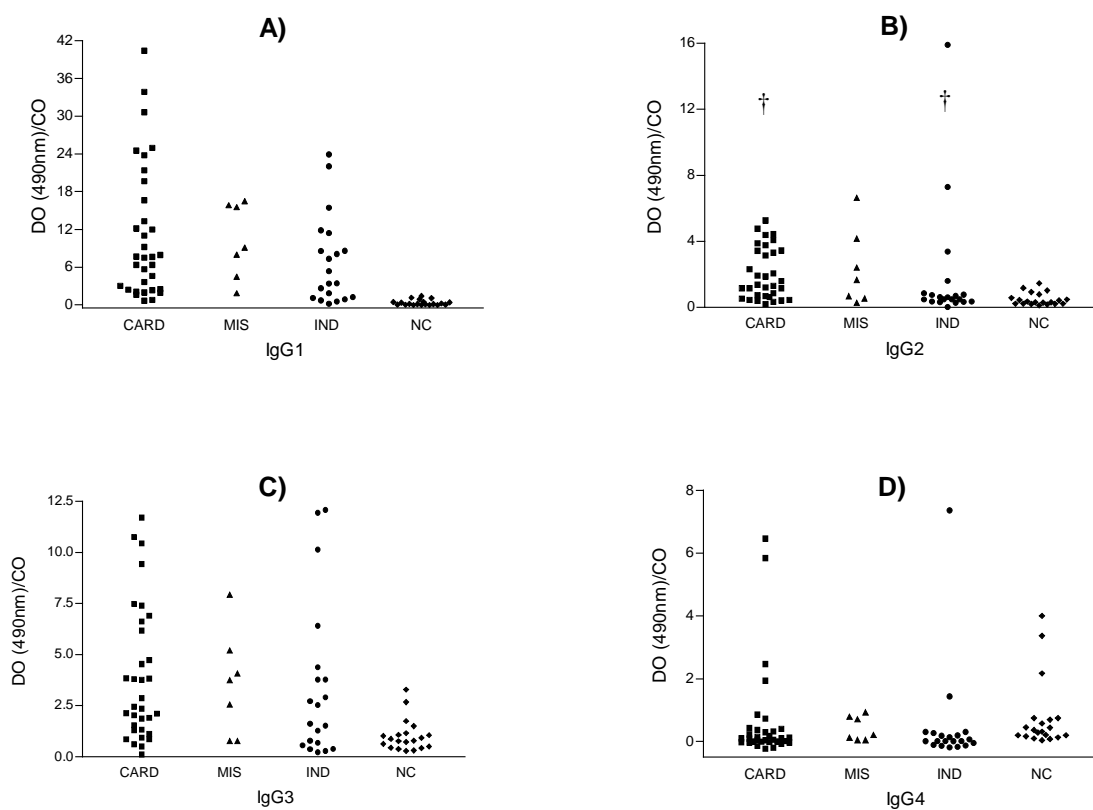


FIGURA 2 – Índices de reatividade das subclasses de IgG de pacientes chagásicos crônicos portadores das formas CARD, MIS e IND, frente ao Ag-Rec FRA. O eixo das ordenadas apresenta os índices de reatividade, resultantes da divisão entre a média de densidade óptica de cada amostra pelo *cut-off*. Os símbolos representam os índices de reatividade de cada amostra. † = isotipos que podem ser diferenciados através deste isotipo ($p=0,010$). CO= *cut-off*; DO= densidade óptica; CARD= forma cardíaca ($n=33$); MIS= forma mista ($n=7$); IND= forma indeterminada ($n=20$) e NC= não-chagásico ($n=20$).

**COMISSÃO DE ÉTICA DO CPqAM/FIOCRUZ****Projeto:**

Título: "Caracterização do perfil isotípico das imunoglobulinas de indivíduos chagásicos frente aos antígenos recombinantes CRA e FRA de *Trypanosoma Cruzi*"

Pesquisador responsável : Yara de Miranda Gomes

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 17 /03

PARECER

A Comissão 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.

Recife, 02 de julho de 2003

Ana Maria A. Santos

Dr^a Ana Maria A. Santos
Médica
Coordenação
CEP/CPqAM/FIOCRUZ