



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE MEDICINA  
Programa de Pós-graduação em Medicina - Cardiologia**

**FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS DOS GENES  
DO INTERFERON GAMA (*IFNG* +874 T/A)  
E DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA (*NOS2A* -954G/C)  
EM UMA COORTE DE 313 PACIENTES  
NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS  
E ASSOCIAÇÃO COM PRESENÇA E GRAVIDADE DE  
CARDIOPATIA**

**Marcelo Teixeira de Holanda**

**Orientadores: Dr. Sérgio Salles Xavier e Dr<sup>a</sup> Maria da Gloria Bonecini de Almeida**

**Rio de Janeiro  
Julho, 2013**

I

**FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS DOS GENES  
DO INTERFERON GAMA (*IFNG* +874 T/A) E DA  
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA (*NOS2A* -954 G/C)  
EM UMA COORTE DE 313 PACIENTES  
NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS  
E ASSOCIAÇÃO COM PRESENÇA E  
GRAVIDADE DE CARDIOPATIA**

**Marcelo Teixeira de Holanda**

**Orientadores: Dr. Sérgio Salles Xavier e Dr<sup>a</sup> Maria da Gloria Bonecini de Almeida**

**Tese submetida ao Corpo Docente do curso de Pós-Graduação em Cardiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Cardiologia.**

**Rio de Janeiro  
Julho, 2013**

**FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DO INTERFERON GAMA (*IFNG* +874 T/A) E DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZIDA (*NOS2A* -954 G/C) EM UMA COORTE DE 313 PACIENTES NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS E ASSOCIAÇÃO COM PRESENÇA E GRAVIDADE DE CARDIOPATIA**

Marcelo Teixeira de Holanda

Orientadores: Dr. Sérgio Salles Xavier e Dr<sup>a</sup> Maria da Gloria Bonecini de Almeida

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina, área de concentração em Cardiologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Cardiologia.

Aprovada em:

---

Roberto Coury Pedrosa, Doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Ronaldo Leão, Doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Edison Migowski, Doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Andréa Silvestre de Sousa, Doutor, FIOCRUZ.

---

Pedro Emmanuel Alvarenga Americano do Brasil, Doutor, FIOCRUZ

Rio de Janeiro  
Julho, 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

Holanda, Marcelo Teixeira.

Frequências dos polimorfismos dos genes do interferon gama (*IFNG* +874T/A) e da óxido nítrico sintase induzida (*NOS2A* -954G/C) em uma coorte de 313 pacientes na fase crônica da doença de Chagas e associação com presença e gravidade de cardiopatia. / Marcelo Teixeira de Holanda. – Rio de Janeiro : Faculdade de Medicina, 2013.

xvii, 80 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Sérgio Salles Xavier e Maria da Glória Bonecini de Almeida.

Tese (doutorado) -- UFRJ, FM, Programa de Pós-graduação em Medicina, Cardiologia, 2013.

Referências bibliográficas: f. 60-73.

1. Doença de Chagas - genética. 2. Doença de Chagas – imunologia. 3. Cardiopatia – mortalidade. 4. Interferon gama – genética. 5. Óxido Nítrico – biosíntese. 6. Óxido Nítrico Sintase Tipo II – genética. 7. Polimorfismo Genético – imunologia. 8. Cardiologia - Tese. I. Xavier, Sérgio Salles. II. Almeida, Maria da Glória Bonecini de Almeida. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro FM, Programa de Pós-graduação em Medicina, Cardiologia. IV. Título.

## DEDICATÓRIA

À minha querida esposa, companheira de sonhos e conquistas. Ufa! Que nossos bebês possam ver que todo esforço sincero e profundo pode ser recompensado com conquistas.

Esta também tem um pouquinho deles.

À meus pais, exemplo-fonte de meu saber, integridade e caráter.

Esta conquista é tão sua quanto minha. Que mesmos nos momentos de dificuldades encontremos forças para celebrar a vida e nossas conquistas.

Aos José(s), Maria(s), Pedro(s) e todos os pacientes que nos entregam suas vidas na fé de proporcionarmos alívio para seus sofrimentos e nos permitem aprender e melhorar nossa prática profissional com um conhecimento crescente sobre esta doença tão negligenciada.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Sergio Salles Xavier, por todo o apoio e orientação iniciados em meu internato e que se prolongou pela residência, mestrado e agora doutorado, quando consistentemente propicia aprendizado e uma forma “clínica” de “olhar” o paciente. Renovo meu sincero agradecimento por me propiciar uma vida profissional na Fiocruz, onde pude entender que atrás de cada diagnóstico existe a vida de um ser humano, com histórias e limitações, onde podemos interferir e até aprender. Sendo referência como pesquisador e médico, me permite aprender continuamente. Obrigado por me guiar na busca do conhecimento necessário para estruturar este trabalho.

A minha orientadora Maria da Glória Bonecini de Almeida, pesquisadora titular do IPEC-Fiocruz e professora titular da Fundação Técnico Educacional Souza Marques. Meu agradecimento pelos momentos de convívio e intenso aprendizado em uma área inteiramente nova para um cardiologista clínico. A organização didática médica atual nos induz a conhecer sequencialmente a estrutura humana e a partir daí as doenças derivadas de desarranjos homeostáticos, mas a tendência atual das pesquisas e do saber nos leva a “olhar” para a estrutura genética do indivíduo de modo que alterações desta estrutura se refletem em alterações ou comportamentos biológicos “macroscópicos” diferentes entre indivíduos. Meu sincero agradecimento por todo o tempo dedicado a mim na confecção deste trabalho.

Aos integrantes da banca de avaliação desta tese, em especial os doutores Andrea Silvestre, Roberto Pedrosa e Ronaldo Leão, pela participação e sugestões na qualificação desta e aos doutores Pedro Emmanuel Alvarenga, colega de longa data na FIOCRUZ, e Edson Migowski, que desde meu internato continuamente me ensinou como olhar clinicamente o paciente cardiológico, meus agradecimentos pelas contribuições na avaliação deste trabalho. E não por último meu agradecimento à doutora e professora Glaucia Moraes, coordenadora substituta da pós-graduação de Cardiologia e que continuamente sugeriu melhorias neste trabalho durante os seminários de tese.

Aos colegas que participaram deste trabalho durante sua longa realização, em especial aqueles do laboratório de imunologia do IPEC, pela marcha analítica de bancada na determinação dos polimorfismos.

“A maioria dos desafios é definida por um desequilíbrio entre a maneira como as coisas são e o modo como julgamos que elas deveriam ser. Como tal, as circunstâncias passam a representar uma incrível oportunidade para corrigir tal desequilíbrio”.

Anônimo

## RESUMO

HOLANDA, Marcelo Teixeira. **Frequências da distribuição dos polimorfismos dos genes do Interferon Gama (*IFNG* +874 T/A) e da Óxido Nítrico Sintase Induzida (*NOS2A* -954G/C) em uma coorte de 313 pacientes na fase crônica da doença de Chagas e associação com presença e gravidade de cardiopatia.** Tese (Doutorado em Medicina – Cardiologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Fundamentos: A doença de Chagas, uma infecção parasítica inicialmente descrita há mais de um século pelo médico brasileiro Carlos Chagas, acomete cerca de três milhões de Brasileiros e causa aproximadamente 5000 mortes a cada ano. Cada paciente carrega um risco potencial de desenvolver lesões cardíacas e atualmente se aceita que a imunidade do indivíduo tem participação fundamental durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, levando tanto a um controle do parasita durante a fase aguda quanto ao desenvolvimento da patologia durante a fase crônica. Os níveis de óxido nítrico (NO) e o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) no soro de pacientes cardíacos e indeterminados apresentam diferenças que podem estar relacionadas à expressão distinta de marcadores genéticos conhecidos como polimorfismos. A atividade da Óxido Nítrico Sintase Induzida (NOSi) e a produção de IFN- $\gamma$  estão diretamente ligados aos polimorfismos expressos pelos pacientes. Na população brasileira, poucas descrições foram feitas a cerca dos polimorfismos do *IFNG* +874 T/A e apenas um do *NOS2A* -954 G/C, mas nenhuma em populações com doença de Chagas (dC). Objetivos: Determinar a frequência dos polimorfismos do *IFNG* +874 T/A e do *NOS2A* -954 G/C em pacientes com dC e sua associação com a presença e gravidade da cardiopatia. Materiais e Métodos: foram estudados 313 pacientes com dC, 143 com critérios eletrocardiográficos para cardiopatia chagásica crônica (CCC), segundo o consenso brasileiro em doença de Chagas (CBDC) e 170 sem cardiopatia aparente (NC). A gravidade da cardiopatia foi definida com base na classificação do CBDC, na presença de insuficiência cardíaca (ICC), na presença de alterações ao ecocardiograma (PAE) e na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). Resultados: A média de idade da população estudada foi de  $55,8 \pm 10,6$  anos com predomínio do sexo feminino. As frequências observadas dos polimorfismos do *IFNG* +874 T/A foram 42,2% para o genótipo AA, 44,1% para o AT e 13,7% para o TT e para os polimorfismos do *NOS2A* -954 G/C foram 94,6% para o genótipo GG, 5,1% para o GC e 0,7% para o CC. Não houve associação entre os polimorfismos do *IFNG* +874 T/A e a presença de cardiopatia ( $p=0,06$ ), já para o *NOS2A* -954 G/C houve associação ( $p=0,02$ ). Em relação à gravidade, o genótipo TT foi associado à FEVE significativamente inferior, em comparação com AT e AA ( $p<0,05$ ). Para os outros critérios de gravidade não houve diferença estatisticamente significativa para a expressão do polimorfismo do *IFNG* +874 T/A. Para o *NOS2A* -954 G/C, não foi observada diferença na expressão dos genótipos relacionado com a gravidade da cardiopatia pela presença de ICC, pelo CBDC ou pela PAE. Conclusões: Nesta população estudada os genótipos mais frequentes foram o AT do *IFNG* +874 T/A e o GG do *NOS2A* -954 G/C. Houve associação entre os polimorfismos do *NOS2A* -954 G/C e o desenvolvimento de cardiopatia, mas

naqueles que apresentam lesões cardíacas, não houve diferenças nos critérios de gravidade. Já para os genótipos do *IFNG* +874 T/A houve uma tendência na associação com presença de cardiopatia e associação do genótipo TT à maior gravidade da cardiopatia expressa por valores mais baixos da FEVE.

Palavras-chave: doença de Chagas. Cardiopatia. Polimorfismos. *IFNG* +874 G/C. *NOS2A* - 954G/C.

## ABSTRACT

HOLANDA, Marcelo Teixeira. **Frequências da distribuição dos polimorfismos dos genes do Interferon Gama (*IFNG* +874 T/A) e da Óxido Nítrico Sintase Induzida (*NOS2A* -954G/C) em uma coorte de 313 pacientes na fase crônica da doença de Chagas e associação com presença e gravidade de cardiopatia.** Tese (Doutorado em Medicina – Cardiologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

**Fundamentals:** Chagas disease, a parasitic infection first described over a century ago by the Brazilian physician Carlos Chagas, is carried by 3 million Brazilians with close to 5000 of those people dying from the disease each year. Each patient carries a potential risk to develop cardiac lesions and nowadays it's well accepted that the host's immune response plays a key role during *Trypanosoma cruzi* infection, leading to either parasitic control during the acute phase or to participation in the pathology development during the chronic phase. Nitric oxide (NO) and gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) levels in the sera from cardiac and indeterminate patients show differences that could be related to different expression of genetic markers called polymorphisms. The activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the production of IFN- $\gamma$  are directly linked to the polymorphism expressed by patients. In Brazilian population few descriptions were published about *IFNG* +874 T/A and only one about *NOS2A* -954 G/C polymorphisms, but no one in Chagas disease. **Objectives:** To determine the frequency of *IFNG* +874 T/A and *NOS2A* -954 G/C polymorphisms in patients with Chagas disease and its association with the presence and severity of heart disease. **Materials and Methods:** We studied 313 patients with Chagas disease, 143 with electrocardiographic criteria for chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), according to the Brazilian consensus on Chagas disease (CBDC) and 170 without apparent heart disease (NC). The severity of the heart disease was defined based on the classification of the CBDC, in the presence of congestive heart failure (CHF), in the presence of changes in the echocardiogram (PAE) and ejection fraction (LVEF). **Results:** The mean age of the study population was 55.8  $\pm$  10.6 years with a predominance of females. The observed frequencies of the *IFNG* +874 T/A polymorphisms were 42.2% for the AA genotype, 44.1% for AT and 13.7% for TT. Frequencies for the *NOS2A* the -954 G/C polymorphisms were 94.6% for the GG genotype, 5.1% for GC and 0.7% for CC. There was no association between *IFNG* +874 T/A polymorphisms and the presence of heart disease ( $p=0.06$ ) whereas for *NOS2A* there was association ( $p=0.02$ ). In relation to gravity, the TT genotype was associated with significantly lower LVEF, compared with AT and AA ( $p<0.05$ ). For other severity criteria there was no statistically significant difference in the expression of *IFNG* +874 T/A polymorphisms. For *NOS2A* -954 G/C polymorphisms no difference was observed in the expression related to the severity of the heart disease by the presence of CHF, CBDC or PAE. **Conclusions:** In this study population the genotypes AT for *IFNG* +874 T/A and GG for *NOS2A* -954 G/C were more frequent. There was an association between *NOS2A* -954 G/C polymorphisms and the development of heart disease, but those who have cardiac lesions, no differences in severity criteria were seen. For *IFNG* +874 T/A polymorphisms there was a trend in association with heart disease and significant association of the TT genotype with greater severity of heart lesions expressed by lower values of LVEF.

**Keywords:** doença de Chagas. Cardiopatia. Polimorfismos. *IFNG* +874 G/C. *NOS2A* -954G/C.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação química em que o NO é produzido .....	8
Figura 2: Representação da resposta imune de pacientes chagásicos após infecção.....	14
Figura 3: Representação da participação das citocinas e microambientes com predomínio de inflamação ou tolerância com as formas clínicas. ....	19
Figura 4: Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	21
Figura 5: Curvas de sobrevida estratificado pela classificação do consenso Brasileiro em doença de Chagas e pela fração de ejeção do VE.....	28
Figura 1: Curva de Kaplan Meier demonstrando a sobrevida cumulativa livre de eventos cardíacos em pacientes com CCC de acordo com o número de fatores de risco ecocardiográficos.....	28
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose das bandas representativas do polimorfismo do gene <i>IFNG</i> +874T/A. ....	32
Figura 8: Esquema do resultado visualizado no gel de eletroforese a 3%, sob luz ultravioleta, do polimorfismo para <i>NOS2A</i> -954G/C.....	33
Figura 9: Resultado visualizado após eletroforese, sob luz ultravioleta, do polimorfismo para <i>NOSi</i> -954G/C.....	34
Figura 10: Representação gráfica da distribuição da idade dos pacientes participantes do estudo.....	36
Figura 11: Distribuição dos estados de origem dos pacientes participantes do estudo. ....	37
Figura 12: Representação da distribuição da idade para os polimorfismos pesquisados.....	41
Figura 13: Distribuição das frequências dos valores das frações de ejeção do ventrículo esquerdo para o grupo de pacientes com cardiopatia (CCC).....	44
Figura 14: Distribuição dos valores da fração de ejeção estratificado pelo genótipo do <i>IFNG</i> +874T/A . ....	45
Figura 15: Distribuição da fração de ejeção estratificado pelo genótipo do <i>NOS2A</i> -954G/C.. ..	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados epidemiológicos, do eletrocardiograma e do ecocardiograma dos grupos CCC e NC.....	38
Tabela 2: Características epidemiológicas e dados do ecocardiograma dos pacientes do grupo cardiopata dividido por estágios clínicos do consenso Brasileiro em doença de Chagas.....	38
Tabela 3: Frequência dos polimorfismos do <i>IFNG</i> +874 T/A e <i>NOS2A</i> -954 G/C na população do estudo.....	40
Tabela 4: Dados das frequências das características epidemiológicas da amostra populacional quando estratificada pelos polimorfismos analisados. ....	40
Tabela 5: Frequências dos genótipos para o <i>IFNG</i> +874T/A entre CCC e NC. ....	42
Tabela 6: Frequências dos genótipos do <i>IFNG</i> +874T/A para análise de dominância. ....	42
Tabela 7: Frequências dos genótipos para o <i>NOS2A</i> -954 G/C entre os grupos CCC e NC. ....	43
Tabela 8: Frequências dos genótipos do <i>NOS2A</i> -954G/C para análise de dominância. ....	43
Tabela 9: Frequência de genótipos para o <i>IFNG</i> +874 T/A estratificada pela presença de Insuficiência Cardíaca e análise de dominância AA vs AT+TT e TT vs AA+AT.....	47
Tabela 10: Análise de dominância dos genótipos para o <i>NOS2A</i> -954 G/C estratificada pela presença de Insuficiência Cardíaca.....	46
Tabela 11: Análise de dominância dos genótipos para o <i>IFNG</i> +874 T/A estratificada pela presença de ecocardiograma alterado.....	47
Tabela 12: Análise de dominância dos genótipos para o <i>NOS2A</i> -954 G/C estratificada pela presença de alterações no ecocardiograma.....	48
Tabela 13: Frequências do polimorfismo do <i>IFNG</i> +874 T/A estratificado pela classificação do consenso brasileiro em doença de Chagas.....	49
Tabela 14: Análise de dominância dos genótipos para o <i>IFNG</i> +874 T/A estratificada pela classificação do Consenso Brasileiro em doença de Chagas.....	50

Tabela 15: Frequências do polimorfismo do *NOS2A* -954G/C estratificado pela classificação do consenso brasileiro em doença de Chagas..... 50

Tabela 16: Análise de dominância dos genótipos para o *NOS2A* -954 G/C estratificada pela classificação do Consenso Brasileiro em doença de Chagas..... 50

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

+874 T/A <i>IFNG</i>	Mutação de timina para adenina na posição +874 do DNA
-954G/C <i>NOS2A</i>	Mutação de guanina para citosina na posição -954 do DNA
BAV 1G	bloqueio átrio-ventricular do primeiro grau
BAV 2G	bloqueio átrio-ventricular do segundo grau
BRE	bloqueio do ramo esquerdo
BRD	bloqueio do ramo direito
BRD + HBAE	bloqueio do ramo direito concomitante a hemibloqueio anterior esquerdo
(CCTTT) <sub>n</sub>	microsatélite pentanucléico
CBDC	consenso Brasileiro em doença de Chagas
CSF	fator estimulador de colônias
dC	doença de Chagas
ECG	eletrocardiograma de 12 derivações
ECO	Ecocardiograma bidimensional com Doppler colorido
EV	extra-sístole ventricular
FC	forma cardíaca
FE	fração de ejeção
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
FI	forma indeterminada
HBAE	hemibloqueio anterior esquerdo
ICC	insuficiência cardíaca congestiva
IL	interleucina
IFN- $\gamma$	Interferon gama
<i>IFNG</i>	Gene do interferon gama

IPEC	Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas
NK	<i>natural killer</i> – assassino natural
NO	radical óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
NOSe	Óxido nítrico sintase endotelial
NOSn	Óxido nítrico sintase neuronal
PBMC	células mononucleares de sangue periférico
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i> – polimorfismos de nucleotídeo único
<i>T. cruzi</i>	<i>Tripanosoma cruzi</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- $\beta$	fator de transformação do crescimento beta

# SUMÁRIO

RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	XIII
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	1
1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA DE CHAGAS .....	2
1.3 AS INCERTEZAS E A AUSÊNCIA DE EXPLICAÇÕES .....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	6
2.1 POLIMORFISMOS.....	6
2.2 DOMINÂNCIA ALÉLICA .....	7
2.3 CITOCINAS .....	7
2.4 AÇÃO DO NO E DAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES.....	8
2.5 OS POLIMORFISMOS DO GENE <i>NOS2A</i> - <i>NOS1</i> .....	11
2.6 O DÚBIO PAPEL DO INTERFERON-GAMA (IFN- $\gamma$ ) NA DOENÇA DE CHAGAS .....	12
2.7 POLIMORFISMOS DO GENE DO INTERFERON GAMA ( <i>IFNG</i> ) .....	15
2.8 COMBINANDO TUDO: A IMUNIDADE NA DOENÇA DE CHAGAS .....	16
3 OBJETIVOS .....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	23
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	23
4.3 SELEÇÃO DE PACIENTES .....	23
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	23
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	24
4.6 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	24
4.7 AVALIAÇÃO CLÍNICA .....	25
4.8 AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA.....	25
4.9 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA .....	25
4.10 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	26
4.11 DEFINIÇÕES .....	26
4.12 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO <i>IFNG</i> +874 T/A .....	29

4.12.1	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	29
4.12.2	EXTRAÇÃO DE DNA .....	29
4.12.3	DEFINIÇÃO DO POLIMORFISMO DE <i>IFNG</i> +874T/A .....	30
4.12.4	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	31
4.13	DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO <i>NOS2A</i> -954G/C .....	32
4.14	METODOLOGIA ESTATÍSTICA .....	35
5	RESULTADOS .....	36
5.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO GERAL E DOS GRUPOS CARDIOPATA E NÃO CARDIOPATA	36
5.2	FREQUÊNCIAS DA DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS NA POPULAÇÃO .....	40
5.3	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E CARDIOPATIA.....	42
5.3.1	PARA <i>IFNG</i> +874 T/A .....	42
5.3.1.1	ANÁLISE DE DOMINÂNCIA PARA OS POLIMORFISMOS DO <i>IFNG</i> +874 T/A .....	42
5.3.2	PARA O <i>NOS2A</i> -954 G/C.....	43
5.3.2.1	ANÁLISE DE DOMINÂNCIA PARA OS POLIMORFISMOS DO <i>NOS2A</i> -954 G/C .....	43
5.4	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA CARDIOPATIA ...	44
5.4.1	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA CARDIOPATIA PELA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VE (FEVE).....	44
5.4.1.1	PARA <i>IFNG</i> +874 T/A.....	45
5.4.1.2	PARA O <i>NOS2A</i> -954 G/C .....	45
5.4.2	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA CARDIOPATIA PELA EXISTÊNCIA DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA .....	46
5.4.2.1	PARA <i>IFNG</i> +874 T/A .....	46
5.4.2.2	PARA O <i>NOS2A</i> -954 G/C.....	47
5.4.3	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA CARDIOPATIA PELA PRESENÇA DE ECOCARDIOGRAMA ALTERADO .....	48
5.4.3.1	PARA <i>IFNG</i> +874 T/A .....	48
5.4.3.2	PARA O <i>NOS2A</i> -954 G/C.....	48
5.4.4	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA CARDIOPATIA PELA GRAVIDADE DO CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS.....	49
5.4.4.1	PARA <i>IFNG</i> +874 T/A .....	49
5.4.4.2	PARA O <i>NOS2A</i> -954 G/C.....	50
6	DISCUSSÃO .....	52
6.1	PARA O <i>IFNG</i> +874 T/A.....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
6.2	PARA O <i>NOS2A</i> -954 G/C.....	55
7	CONCLUSÕES.....	58

8 LIMITAÇÕES.....	59
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
APÊNDICE A – CONSENTIMENTO INFORMADO .....	74
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO .....	80

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Após cerca de um século da publicação do trabalho original de Carlos Chagas (CHAGAS, 1908), a doença que recebeu seu epônimo persiste como importante causa de mortalidade e morbidade não só no Brasil como em outros países de áreas não endêmicas (COURA et al, 1984). Muito já foi descrito sobre a doença, porém há muito ainda por ser entendido e comprovado. Desde os trabalhos iniciais feitos por Carlos Chagas (CHAGAS, 1908; 1916), em que a transmissão vetorial, as formas hemáticas do parasito, a sintomatologia clínica e primórdios de diagnóstico laboratorial foram reconhecidos *in loco*, os avanços foram consideráveis no sentido de se aprimorar o diagnóstico laboratorial (NDAO et al., 2010), descobrir os órgãos-alvo do parasito e lesões características nestes órgãos (MARIN-NETO et al., 2007), desenvolver medicamentos para tratamento da doença (DE CASTRO et al., 2011; MARIN-NETO et al, 2009) e propor técnicas (cirúrgicas ou não) para tratamento das complicações cardíacas e não-cardíacas. Os marcapassos substituem o falho sistema de condução cardíaco, os estudos eletrofisiológicos diagnosticam e tratam arritmias ventriculares e os cardiodesfibriladores implantáveis foram desenvolvidos para a prevenção e tratamento da mais letal das complicações, a morte súbita (MARTINELLI et al., 2012; MARIN-NETO, 2011). Certamente o genial médico ficaria feliz com os avanços obtidos, entretanto muito há por ser investigado.

Apesar do grande conhecimento disponível nos meios acadêmicos dos países da América latina, inclusive com importantes publicações direcionadas ao diagnóstico e tratamento da doença de Chagas (ANDRADE et al., 2011), as frequentes migrações internacionais legais e ilegais expõem indivíduos e sistemas de saúde a uma nova doença transmissível por formas de transmissão pouco frequentes e até mesmo desconhecidas em países não endêmicos para a doença (DI GIROLAMO et al., 2010).

Mesmo com a intervenção governamental nos países latinos conhecidos como países do cone sul, que culminou com a interrupção da transmissão vetorial em alguns destes países (CARVALHO, 2001), ainda há descrição, inclusive, de contágio com desenvolvimento de doença aguda, em algumas regiões da Amazônia legal brasileira (COURA, 2012; XAVIER, 2006; VIÑAS et al., 2006). No Brasil, atualmente, predominam os casos crônicos de doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado, sendo a maioria infectada pela via vetorial, forma de transmissão intimamente relacionada às baixas condições sócio-econômicas

da população. A estimativa mais recente de infectados no país é de aproximadamente três milhões de pessoas (PETHERICK, 2011).

## 1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA DE CHAGAS

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais dos infectados pelo *T. cruzi* permite classificar a infecção em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda compreende os fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros dois a quatro meses de infecção, além de alta parasitemia (DIAS, 1989; MAZZA, 1940). Manifestações sistêmicas, como mal estar, astenia, febre, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia, podem ser também observadas (REZENDE, 1994). Em casos graves, a miocardite com insuficiência cardíaca aguda e/ou a encefalite podem ser observadas. Devido à alta mortalidade em crianças e jovens (DIAS, 1987), o tratamento etiológico nessa fase é indicado, qualquer que tenha sido o mecanismo da infecção (BRASIL, 2005).

O conjunto de pacientes infectados e que atinge a fase crônica persiste com a sorologia positiva e pode apresentar alterações discretas em exames complementares de modernas técnicas de investigação. De forma a padronizar a classificação clínica, este momento de doença permite dividir os pacientes em grupos baseando-se principalmente nas alterações no eletrocardiograma (ECG) e no ecocardiograma (ECO), dentre outros exames complementares (BRASIL, 2005). Em cerca de 60-70% dos pacientes não se encontram alterações nestes exames, sendo então classificados como pacientes na forma indeterminada (BRASIL, 2005). Alguns pacientes permanecem nesta forma indefinidamente enquanto outros, após intervalo de 10 a 20 anos, evoluem de forma lenta e progressiva para alguma das formas crônicas determinadas da doença (PEREIRA-BARRETO, 1994), com aparecimento de evidências de comprometimento orgânico. Sabe-se que os pacientes no estágio indeterminado têm geralmente um bom prognóstico (RIBEIRO & ROCHA, 2007), e podem persistir por muitos anos sem manifestar progressão de doença (DIAS, 1989). O prognóstico do paciente chagásico na forma indeterminada é semelhante ao da população geral enquanto o eletrocardiograma estiver normal, sendo que a realização desse exame de maneira seriada pode detectar a evolução para a forma cardíaca (BRASIL, 2005).

Os demais pacientes podem apresentar alterações cardíacas (20-30%) ou digestivas (10-20%) e um pequeno grupo pode apresentar alterações cardíacas e digestivas (<10%) (TANIWITZ, 2009). Os pacientes cardiopatas podem ainda ser subdivididos em outro grupo

baseado na ausência e presença de disfunção ventricular esquerda (BRASIL, 2005). Quando comparados entre si, estes últimos têm mortalidade aumentada, sendo marcante a elevada frequência e complexidade das arritmias cardíacas e sua combinação com distúrbios da condução do estímulo atrioventricular e intraventricular (HOLANDA, 2008), a elevada incidência de morte súbita e fenômenos tromboembólicos (SOUSA et al., 2008), assim como de aneurismas ventriculares. Nos cardiopatas são descritos como principais mecanismos de óbito a morte súbita, os eventos embólicos e a insuficiência cardíaca refratária (XAVIER et al., 2006). Dentre as características mais peculiares da cardiopatia chagásica crônica destaca-se de maneira especial seu caráter fibrosante, considerado o mais expressivo dentre as miocardites. A cardiopatia crônica constitui-se na forma mais importante e grave da doença de Chagas, tanto em função de sua frequência significativa, mas principalmente pela elevada morbidade-mortalidade da doença, com grande impacto social, de saúde pública e médico-trabalhista dela decorrentes (SCHMUNIS, 1994; MARTINS-MELO et al., 2012).

Relatórios da OMS reforçam a necessidade de maiores investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos com ação anti-tripanosoma, haja visto o crescente risco de contaminação por via sanguínea, congênita e por transplante de órgãos (WHO, 2013). Além disso, o efeito dos fármacos atuais no controle da doença crônica e clinicamente manifesta é questionável e há necessidade de se desenvolver terapêuticas para prevenção das complicações crônicas (REMME et al., 2006). Estudos com objetivo de se estabelecer a eficácia do tratamento antiparasítico em pacientes cardiopatas crônicos (MARIN-NETO et al., 2009) e com objetivo de desenvolver novos fármacos estão em andamento (BASTOS et al., 2013; GONZALEZ & CERECETTO, 2011; URBINA, 2009) e podem fornecer novas propostas de tratamento para os pacientes que já desenvolveram a cardiopatia.

### 1.3 AS INCERTEZAS E A AUSÊNCIA DE EXPLICAÇÕES

Ainda que existam diferenças relacionadas às cepas do parasita, a ciclos de reinfeção, e a disponibilidade de um eficaz tratamento ou não da infecção, postula-se que fatores genéticos do paciente estejam relacionados com a diversidade da evolução clínica. Sabe-se que em pacientes infectados e imunodeprimidos (coinfectados por HIV e pós-transplantes) há elevada frequência de recidiva clínica da doença de Chagas (MARTINS-NETO, 2012), de modo que a homeostase imunológica parece estar relacionada com a possibilidade de

desenvolvimento de doença manifesta. Assim, “olhar” para o conjunto de reações imunológicas do indivíduo passou a ser a grande perspectiva de explicação para os mecanismos de progressão de doença (MACEDO et al., 2004). Certamente o padrão de codificações de respostas metabólicas está diretamente ligado às características genéticas de cada indivíduo, de modo que a expressão fenotípica dos sistemas genéticos pode ser uma grande fonte de explicações ainda não abordada.

Historicamente pode-se descrever o momento atual como “era genômica”, em que a doença passou a ser encarada como um produto da interação de dois genomas altamente variáveis: o do parasito e o genoma humano. Este “momento” foi precedido pela “fase do parasita” que se iniciou após o momento da descrição inicial da doença, quando todos os esforços foram direcionados para fornecer explicações sobre métodos biológicos e bioquímicos que associassem a variabilidade do parasita e a forma clínica da doença. O fracasso desses esforços, juntamente com a escassez de parasitas no sangue e em tecidos de pacientes cronicamente sintomáticos iniciou a “fase autoimune”, em que o parasita é deixado para um segundo plano, exceto como fornecedor de epítomos de reação cruzada capaz de desencadear reações imunológicas. Porém, a descoberta de novos métodos de detecção do *T. cruzi* resgatou a participação do parasita na patogênese da doença de Chagas (MACEDO, 2004). Dessa maneira, a busca por mecanismos de evolução para formas clínicas de maior gravidade se voltou para um nível imunológico e molecular, em que o perfil das relações enzimáticas, humorais e imunológicas pode estar relacionado a um conjunto de marcadores genéticos (polimorfismos) já existentes no indivíduo quando ele é infectado e que proporcionam diferenças na resposta ao parasito quando da infecção inicial e posteriormente na evolução clínica da doença. Em que pesem as diferenças individuais (raça, sexo, idade de infecção, reinfecção, nível sócio-econômico, presença de comorbidades) ainda necessita-se de uma (ou várias) associação (ões) que possa(m) explicar o porquê de existirem, por exemplo, pacientes jovens sem comorbidades e com cardiopatia grave, caracterizada por disfunção grave do ventrículo esquerdo, porém sem clínica de insuficiência cardíaca e outros pacientes mais idosos em que não há cardiopatia ao eletrocardiograma e ao ecocardiograma.

Se estivesse disponível método complementar que permitisse a determinação de um perfil genético com associação para estágios de doença de maior gravidade talvez fosse possível instituir tratamento imunomodulador de forma a influenciar positivamente a doença. Como exemplo pode-se citar doenças como Psoríase e Artrite Reumatóide, que já têm sido muito bem controladas com o uso dos chamados agentes biológicos (AGUILAR-LOZANO et al., 2013; AHN et al., 2013), os quais modificam a ativação de citocinas e células

responsáveis pela inflamação que provocam, respectivamente, os sintomas cutâneos e articulares. Esta proposta poderia ser aplicada em pacientes cardiopatas crônicos em que há alteração eletrocardiográfica acompanhada ou não de alterações segmentares ao ecocardiograma. Talvez estes pacientes, que se enquadrariam nos estágios A e B1 do consenso Brasileiro em doença de Chagas, pudessem se beneficiar de um tratamento imunomodulador que interrompesse ou alentece a progressão da cardiopatia.

Atualmente a cardiopatia chagásica é dividida em estágios, baseado nas alterações clínicas e de exames complementares como o ECG e o ECO, o que sugere os tratamentos medicamentoso e não medicamentoso (BRASIL, 2005). Se houvesse disponibilidade de se obter um diagnóstico genético capaz de dar informações sobre progressão e gravidade de doença, possivelmente as diretrizes de tratamento seriam modificadas no intuito de incluir esta informação como parte de um escore ou perfil que agrega risco e pior desempenho da cardiopatia e talvez se pudesse proporcionar maior sobrevida a estes pacientes.

O papel de vários mediadores inflamatórios tem sido estudado, principalmente em modelos experimentais, para associá-los com as formas clínicas de maior gravidade. O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é citocina de elevada importância nos processos inflamatórios de várias doenças infecciosas e parasitárias. Sua presença nos processos inflamatórios está relacionada com a imunidade inata, na defesa do organismo contra a replicação do agente nocivo. Seu efeito resulta na ativação de específicos grupos celulares e na produção do radical óxido nítrico (NO), outro “ator” do processo inflamatório e de defesa contra a multiplicação de agentes patogênicos. No caso específico da doença de Chagas, ratos com deleção específica do receptor de interferon têm maior susceptibilidade para infecção e reduzida produção de radical óxido nítrico (ROTTEMBERG et al., 1996).

Atualmente há pouca informação dos polimorfismos do *IFNG* +874 T/A e do *NOS2A* - 954G/C expressos na população do Brasil. Apenas um trabalho de uma amostra populacional Colombiana analisou a frequência do polimorfismo do *IFNG* +874 T/A em doença de Chagas (TORRES et al., 2010). Em países Africanos há algumas descrições relacionadas ao polimorfismo da Óxido Nítrico Sintase induzida em formas clínicas da Malária (KUN et al., 2001). Em doença de Chagas especificamente não há nenhuma publicação Brasileira, ainda mais relacionando a frequência dos polimorfismos com presença e gravidade da cardiopatia.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 POLIMORFISMOS

O produto de uma mutação é um novo alelo. O novo alelo pode conferir uma melhoria no valor adaptativo do organismo, sendo considerado benéfico; pode não interferir no valor adaptativo do organismo, sendo considerado neutro ou pode impedir ou reduzir a capacidade funcional do organismo, sendo considerado deletério. Esta avaliação, no entanto, somente é possível a partir da expressão da nova variante. Considera-se a mutação como base da evolução, a fonte primária de toda a variabilidade genética. Ao contrário da recombinação, que reorganiza a variação previamente existente, a mutação *cria* os novos elementos (alelos) que irão (ou não) fazer parte do conjunto genético de uma população.

Define-se polimorfismo genético como a ocorrência de múltiplos alelos (genes correspondentes de dois cromossomos homólogos) em um *locus* (local ocupado por um gene em um cromossomo), no qual pelo menos dois alelos aparecem com frequências superiores a 1% na população (THOMPSON et al., 1993).

A base para o polimorfismo entre os alelos são as diferentes mutações que podem ocorrer na sequência de DNA. As alterações em um *locus* incluem aquelas que mudam a sequência da proteína sem mudar sua função, aquelas que criam proteínas com diferentes atividades e aquelas que criam proteínas diferentes e não funcionais.

Os polimorfismos podem ser usados como marcadores genéticos para distinguir diferentes formas hereditárias de um gene em estudos de famílias, de modo que com as modernas técnicas de DNA recombinante tem sido possível determinar os polimorfismos que consistem por exemplo, em uma troca de base, uma deleção, uma inserção casual ou na presença de números variáveis de cópias repetidas de um determinado fragmento de DNA.

Os marcadores genéticos mais usados nos estudos de associação são os SNPs (*single nucleotide polymorphisms* – polimorfismos de nucleotídeo único). São considerados como uma classe mais geral de polimorfismos porque surgem a partir de mutações em nucleotídeos únicos de uma determinada sequência de DNA, as quais podem ou não gerar sítios de reconhecimento para enzimas de clivagem (endonucleases de restrição). Quando ocorrem em ambos os genes de cada cromossomo, em frequência adequada (>1%), provocam o aparecimento de um polimorfismo. A seleção natural favoreceu a introdução de SNPs

bialélicos nos genes das citoquinas, o que resulta na variação da produção, quantidade e atividade da proteína ao invés da qualidade (presença ou não da proteína) (OLLIER, 2004).

## 2.2 DOMINÂNCIA ALÉLICA

O genótipo de um indivíduo pode ser deduzido a partir da observação de variações em certas características. Estas características são conhecidas como fenótipos e resultam da expressão dos genes. Quando existem dois alelos, existem três genótipos possíveis: homozigóticos e heterozigóticos. No caso dos heterozigóticos, e dado que se podem exprimir dois genes diferentes para o mesmo *locus*, o seu fenótipo irá definir as relações de dominância entre estes dois alelos. Se a variação se expressa numa escala quantitativa, pode haver dominância completa, incompleta ou sobredominância. A dominância é completa quando o indivíduo heterozigótico tem o fenótipo igual a um dos homozigóticos, que se diz dominante. A dominância incompleta ocorre quando o heterozigótico tem um fenótipo distinto de qualquer um dos homozigóticos, sendo seu valor fenotípico intermediário entre os que representam os dois homozigóticos. A sobredominância ocorre quando o fenótipo do heterozigótico é distinto e superior (ou inferior) ao de qualquer dos homozigóticos, ou seja, quando se situa fora dos limites dos dois homozigóticos. A co-dominância é diferente das outras relações entre alelos porque se define pela presença de dois fenótipos (de ambos os homozigóticos correspondentes) no heterozigótico e não se define em uma escala quantitativa. A co-dominância é bastante comum quando se trata de fenótipos moleculares (mobilidade eletroforética de proteínas, por exemplo) ou definidos por técnicas de reconhecimento molecular (anti-soros, por exemplo). Como exemplo pode-se retratar o grupo sanguíneo ABO, em que os indivíduos do grupo AB apresentam tanto o fenótipo A (aglutinação pelo soro anti-A) como o fenótipo B (aglutinação pelo soro anti-B).

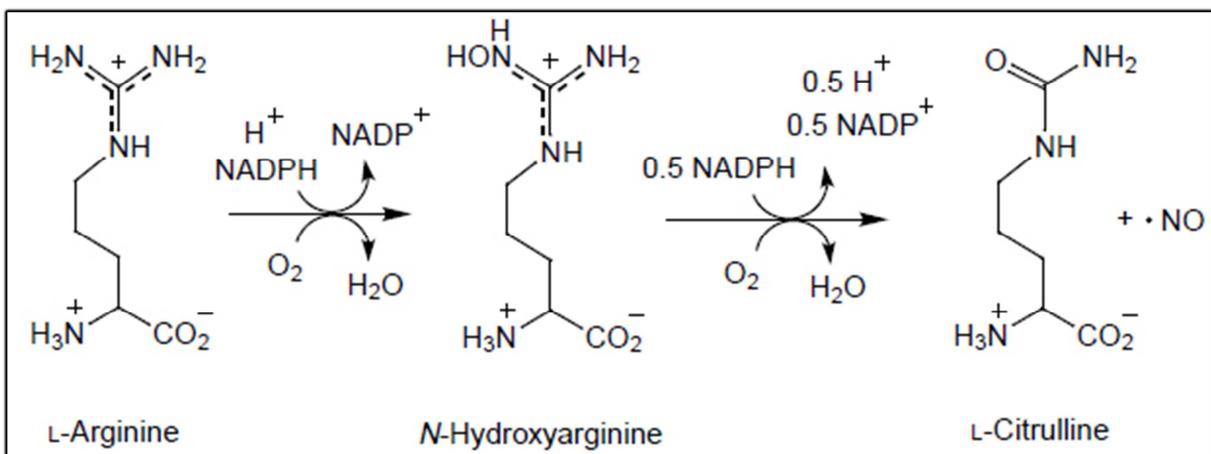
## 2.3 CITOCINAS

Citocina é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais intercelulares durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extra-celulares que podem ser produzidos por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos e outras não linfóides. Todas as citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos, algumas contendo moléculas de glicoproteínas. As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN),

interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ), e fator de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ ). Considerando-se uma classificação funcional, podem ser divididos em mediadores e reguladores da imunidade inata (que são produzidos pelos macrófagos, estimulados por microorganismos e estimulam ou inibem as reações inflamatórias – interleucinas 1 (IL-1), 6 ( IL-6), 12 (IL-12), 16 (IL-16), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon alfa (IFN- $\alpha$ ), interferon beta (INF- $\beta$ ) e mediadores de regulação da imunidade específica (que são produzidas em resposta à ativação dos linfócitos T e que potencializam as reações imunológicas – interleucina 2 (IL-2), 4 (IL-4), TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ), além de estimuladores da proliferação e diferenciação de precursores hematopoiéticos.

#### 2.4 AÇÃO DO NO E DAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES

A óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a transformação da L-arginina para L-citrulina e NO (Figura 1). Podem ser descritas 3 isoformas da enzima: neuronal (NOS<sub>n</sub>), endotelial (NOS<sub>e</sub>) e a induzível (NOS<sub>i</sub>). Tanto a NOS<sub>n</sub> quanto a NOS<sub>e</sub> são constitutivas e sua atividade enzimática é cálcio dependente (WANG, 1995). A NOS<sub>i</sub> é normalmente ausente no coração normal, mas sua expressão é rapidamente ativada por inflamação, mediada por fatores transcricionais induzíveis por citocinas como o interferon. As isoformas da NOS modulam diversos mecanismos moleculares na função cardíaca sistólica, diastólica e cronotrópica tanto em situações normais quanto patológicas.



**Figura 2: Reação química em que o NO é produzido (Retirado de GROVES & WANG, 2000).**

Uma importante observação deve ser feita com relação à compartimentalização do efeito do produto das isoformas. O NO produzido por uma isoforma específica não atua como um agente mensageiro altamente difundível pelo cardiomiócito. No tecido, o NO tem dois efeitos principais: estimular a atividade da guanilato ciclase, uma enzima que produz GMPc do GTP e nitrosilar a tirosina e os grupos tióis da cisteína nas proteínas. Com a nitrosilação, as proteínas podem mudar sua conformação, o que permite que o NO seja um importante regulador da transdução da sinalização intracelular (UMAR, 2010).

Sob circunstâncias normais o NO exerce funções no miocárdio, como a aceleração do relaxamento e regulação do tônus vascular. A NOSe está localizada em grande parte na cavéola sarcoplasmática e túbulos-T, sítios onde a caveolina-3 também está localizada e onde várias vias de sinalização tem sido mostradas como moduladas pelo NO (UMAR, 2010). Além disso, a NOSe tem papel anti-aterogênico importante à medida que impede a proliferação de células musculares lisas na aorta de ratos, inibe a adesão monocitária às camadas de células endoteliais aórticas e impede a agregação plaquetária induzida por colágeno (RADOMSKI, 1990). Os inibidores da enzima conversora de angiotensina foram descritos como indutores da expressão de NOSe e da biodisponibilidade de NO, participando dos efeitos benéficos destes fármacos na melhora dos sintomas de insuficiência cardíaca (LINZ et al., 1999).

A estimulação da NOSi pelo IFN-  $\gamma$  e IL-1 $\beta$  induz apoptose em cardiomiócitos de ratos recém nascidos por um processo independente da ativação da guanilato ciclase e do GMP cíclico (ARSTALL et al., 1999). De forma geral, o NO derivado da NOSi tem efeitos deletérios ao miocárdio de modo que ratos com expressão aumentada de NOSi sofrem com fibrose cardíaca, morte celular dos cardiomiócitos, hipertrofia cardíaca e dilatação cardíaca. Enquanto alguns ratos com super expressão de NOSi desenvolvem insuficiência cardíaca, a maioria dos animais morrem por bloqueio átrio-ventricular e assistolia (MUNGRUE et al., 2002).

Cardiomiócitos de pacientes e animais experimentais com insuficiência cardíaca têm expressão aumentada da NOSi (DREXLER et al., 1998). Em corações dilatados e disfuncionates provavelmente ocorreu um estresse nitrosativo relacionado com a NOSi, situação patológica esta caracterizada pela acumulação a níveis tóxicos de proteínas S-nitrosiladas. Além disso, a abundância de NO derivado da NOSi serve como fonte de espécies ativas de nitrogênio que contribuem para a hipertrofia e dilatação ventricular (ZANG et al., 2007). A elevada indução de NOSi por citocinas provoca apoptose dos miócitos (ARSTALL et al., 1999), de modo que pode este mecanismo ser responsável pelo elevado número de

miócitos em apoptose observados nos pacientes e em modelos experimentais de insuficiência cardíaca (HAYWOOD et al., 1996; VEJLSTRUP et al., 1998; CHEN et al., 2002).

Do ponto de vista celular, é sabido que o NO e seus derivados produzidos por macrófagos ativados são citotóxicos e citostáticos para uma variedade de patógenos (MACMICKING, 1997). Baseando-se nisso, alguns trabalhos experimentais descrevem a importância do NO na participação como defesa contra o *T. cruzi* tanto *in vivo* quanto *in vitro* (VESPA, 1994; HOLSCHER, 1988), enfatizando-se produção aumentada e significativamente diferente no plasma de pacientes chagásicos em comparação com pacientes soronegativos (PÉREZ-FUENTES et al., 1998).

Modelos de estudos experimentais com ratos são utilizados porque as alterações imunológicas, patológicas e as mudanças no eletrocardiograma são semelhantes com as que acontecem nos seres humanos (POSTAN et al., 1986). Com objetivo de estudar a participação da NOSi nestes modelos experimentais, alguns autores utilizaram a supressão do gene da enzima, tendo sido descrito que os ratos infectados estudados não morrem por miocardite aguda, mas evoluem para a cardiopatia crônica, com maiores dilatação e disfunção ventricular, determinadas por histologia, ecocardiografia transtorácica e ressonância magnética nuclear (CHANDRA et al., 2000).

Quando se analisa outras doenças parasitárias como a malária, pesquisas evidenciam a alta produção de NO em pacientes com anemia grave, porém com rápida cura parasitológica, sugerindo uma participação acentuada desta via da imunidade inata no controle da replicação do parasita (KREMSNER, 1996; KUN, 1998). Em modelos experimentais da toxoplasmose, a expressão de altas quantidades de NOSi com altos níveis de atividade tem participação fundamental na resistência contra a infecção pelo parasito (LI et al., 2012). Na tuberculose, a expressão de NOSi foi descrita como importante no controle da infecção (NICHOLSON et al., 1996; LEANDRO et al., 2009).

O NO diretamente mata o parasita *in vitro* (VESPA et al., 1994), afetando o *T. cruzi* através da modificação química de proteínas contendo cisteína e/ou por ligação a metaloproteínas que mediam importantes processos metabólicos. A força da toxicidade do NO depende da sensibilidade do parasita, que difere entre as várias cepas existentes e de acordo com o microambiente fisiológico. Recentemente relatou-se que o NO pode inibir a atividade catalítica da cruzipaina, a principal proteinase cisteínica papaína-like no *T. cruzi* e que é análoga a uma proteína no *Plasmodium spp.*, efeito dose-dependente que é atribuído a S-nitrosilação da Cys25, um resíduo catalítico presente no sítio ativo da cruzipaina (VENTURINI et al. 2000). Outra forma de controle seria um mecanismo adicional pelo qual o

NO pode levar a redução das concentrações de um importante fator de crescimento como o ferro e assim afetar o metabolismo do *T. cruzi* (CICCARELLI et al., 2007). O NO induz nitrosilação do grupo heme da hemoglobina, hematina ou heme, que são as principais fontes de ferro. Assim, o eritrócito é local onde ocorre o stress oxidativo durante a infecção aguda pelo parasita por ser o local onde existem maiores quantidades de estruturas químicas antioxidantes. A neutralização em desequilíbrio desta resposta oxidativa leva a alterações hematológicas (por exemplo, anemia), que são observados na fase aguda da infecção do *T. cruzi* (MALVEZI et al., 2004).

## 2.5 OS POLIMORFISMOS DO GENE *NOS2A* - NOSi

O polimorfismo da NOSi se baseia na mutação de um único nucleotídeo (SNP) ou nas variações de repetição do microssatélite pentanucléico (CCTTT)<sub>n</sub> da região promotora do gene da enzima, as quais foram evidenciadas como importantes para a regulação transcricional da expressão da NOSi (WARPEHA, 1999) e especulados como importantes para a susceptibilidade da infecção crônica da doença de Chagas e para a cardiopatia.

A NOSi é codificada por um gene polimórfico conhecido como *NOS2A* no cromossomo 17q11.2-q12. Os SNPs na região promotora do gene que codifica a enzima (-954G → C, -1173C → T, -1659 A → T) têm sido relacionados a aumento da síntese de NO (HOBBS, 2002). Esta região do gene humano situa-se a partir de -0,7 a -2,6 kb a montante do início da transcrição e que contém os sítios de DNA importantes para a ligação de proteínas ativadoras, de transdutores de sinal e de fatores de repressão de proteínas (COIA, 2005). É esta região em que várias mutações estão associadas com a expressão da NOSi *in vivo* (HOBBS, 2002). A variante -954G→C foi originalmente relatada em uma área Africana de malária endêmica, o que sugere que esta mutação surgiu como uma consequência da pressão seletiva do parasita (LEVESQUE et al., 2010). A sequência de mutação para o íntron do gene da NOSi na posição -954 G/C gera os possíveis genótipos G/G, G/C e C/C, os quais conferem três fenótipos relacionados à intensidade da síntese enzimática: baixa, intermediária e alta, respectivamente. Não há relatos adicionais sobre a frequência do polimorfismo da NOSi em populações brasileiras (LEANDRO et al., 2009).

Em uma população peruana estudada para a associação entre o polimorfismo do gene *NOS2A* e a infecção pelo *T. cruzi* e evolução para cardiopatia, 76 pacientes com sorologia positiva foram submetidos à determinação do polimorfismo do gene contra 78 indivíduos

controles. Padrões de repetição entre 8-17 vezes foram encontrados, com 12 (33%) e 15 (15%) repetições sendo as mais frequentes com uma distribuição bimodal suave, diferentemente do observado em populações africanas (uma distribuição bimodal bem evidente) e nos caucasianos (distribuição em forma de sino). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os pacientes com sorologia positiva e os controles na frequência de repetições bem como entre pacientes assintomáticos e com cardiopatia (XU et al., 2000).

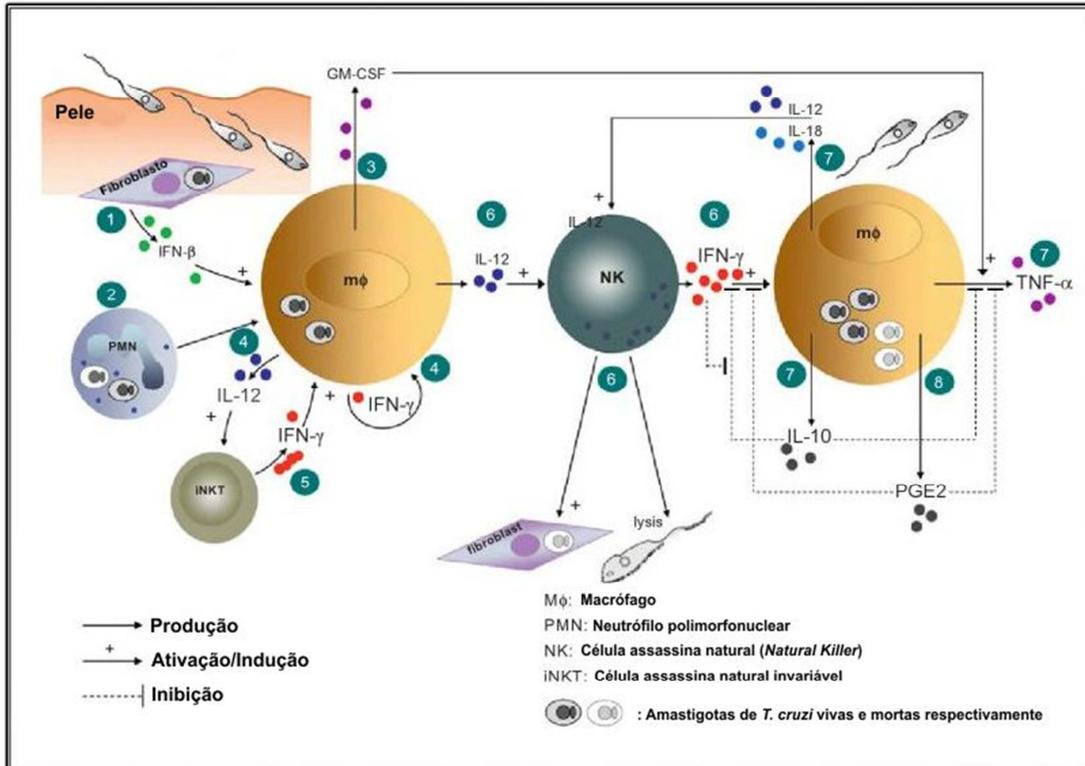
## 2.6 O DÚBIO PAPEL DO INTERFERON-GAMA (IFN- $\gamma$ ) NA DOENÇA DE CHAGAS

O IFN- $\gamma$  é codificado por um único gene e pertence a uma família de proteínas, porém tem uma característica que o diferencia dos demais, a atividade imunológica (GRAY & GOEDDEL, 1982). A secreção da citocina parece estar associada com forma severa da cardiopatia chagásica crônica, demonstrada pelos altos níveis de IFN- $\gamma$  secretado após estímulo *in vitro* de células mononucleares periféricas com antígenos parasitários (BARROS-MAZON et al., 2004; DE TITTO et al., 1985). De modo interessante, níveis de IFN- $\gamma$  parecem não decair após a cura parasitológica em pacientes tratados com benzonidazol (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; CORRÊA-OLIVEIRA et al., 1999). Desta forma, o IFN- $\gamma$  estaria envolvido em ampliar o efeito citotóxico de células TCD8<sup>+</sup> (REIS et al., 1997), predominante nos infiltrados inflamatórios cardíacos (HIGUCHI et al., 1993), já tendo sido descrita sua presença nas lesões inflamatórias miocárdicas (REIS et al., 1997). Recentemente foi descrito que pacientes com cardiopatia dilatada apresentaram um número maior de células T CD8<sup>+</sup> expressando IFN- $\gamma$  do que pacientes com cardiopatia chagásica não dilatada e aqueles na forma indeterminada, após estímulos com antígenos (LORENA et al., 2010).

Contudo, outras linhas de pesquisa vêm descrevendo papel benéfico para a citocina interferon gama durante a evolução da cardiopatia chagásica crônica. Assim, em um grupo pequeno de pacientes (n=28), foi descrito não haver associação aos níveis elevados de IFN- $\gamma$  produzido após estímulo com a proteína recombinante trans-sialidase em pacientes com diferentes formas clínicas, apesar de não ter sido descrita como a classificação clínica dos pacientes foi realizada (RIBEIRÃO et al., 2000). Da mesma forma, após estímulo com peptídeos sintéticos derivados de proteínas do *T. cruzi*, foi possível identificar uma alta frequência de respondedores entre os pacientes em estágios precoces de cardiopatia e baixa frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  em pacientes com a forma mais severa da

cardiopatía chagásica crônica, sendo então sugerido pelos autores que a frequência da produção de IFN- $\gamma$  pelas células T de pacientes com a cardiopatía chagásica crônica esteja associada com um histórico de exposição recente (LAUCELLA et al., 2004). Infelizmente estes autores não discutem o tempo de exposição e/ou doença para a casuística estudada. Em estudo endereçado para a detecção de múltiplas citocinas, foi descrito que pacientes com cardiopatía chagásica crônica são produtores de citocinas predominantemente regulatórias, enquanto pacientes na forma indeterminada produzem citocinas inflamatórias (CUNHA-NETO et al., 1998). No entanto, apesar do percentual de células produtoras de IFN- $\gamma$  terem sido mais representativo em pacientes com cardiopatía chagásica crônica, sendo estas T CD8<sup>+</sup>, não há em geral aumento de células produtoras de IFN- $\gamma$  em relação aos indivíduos sadios (VITELLI-AVELAR et al., 2008).

A resposta imune estruturada durante a fase inicial da infecção pelo *T. cruzi* certamente pode influenciar o desenvolvimento da cardiopatía (Figura 2) a curto ou longo prazo e em intensidade variável. Apesar do papel do IFN- $\gamma$  ainda estar sendo definido, vários fatores como a carga parasitária, as cepas do *T. cruzi* e a genética do hospedeiro podem também ser de igual importância.



**Figura 3: Representação da resposta imune de pacientes chagásicos após infecção (Modificado de TRUYENS & CARTIER, 2010).** 1. No sítio da entrada do parasita, fibroblastos são infectados, o que desencadeia a produção de IFN- $\beta$  por uma via independente dos receptores de superfície toll-like que ainda não foi identificada. Esta produção pode levar até 24h para se iniciar. 2. Os neutrófilos rapidamente infiltram o local e iniciam a fagocitose e morte de parasitas. 3. Estes são seguidos pelos macrófagos que, após infecção, iniciam a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (não representada) e produção de CSF GM (capaz de lisar tripomastigotas não mostrados). 4. Os macrófagos são estimulados pelo IFN- $\beta$  a produzir pequenas quantidades de IL12 e IFN- $\gamma$ , desencadeados por amastigotas intracelulares; proteínas dos grânulos liberados por neutrófilos também contribuem para a ativação de macrófagos. 5. Pode-se especular que a IL-12 ativa as células assassinas naturais para produzir IFN- $\gamma$ . 6. Este fornecimento de IFN- $\gamma$  aumenta a liberação de IL-12 (e talvez baixas quantidades de IL18) por macrófagos infectados, o que vai ativar as células assassinas naturais a produzir IFN- $\gamma$  e induzir a morte de tripomastigotas e a morte dependente de NO em macrófagos e outras células como fibroblastos. 7. A infecção está se espalhando e a ainda maior oferta de IFN- $\gamma$ , em conjunto com a liberação de tripomastigotas extracelulares, promovem a indução de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL6) e anti-inflamatórias (IL-10), bem como moléculas tripanocidas (NO); O IFN- $\gamma$  também regula positivamente a produção de IL18 por macrófagos infectados. O TNF- $\alpha$  interage com o IFN- $\gamma$  para induzir a síntese de NO (não representada), enquanto GM CSF estimula a produção de TNF- $\alpha$  e NO, e assim, o controle da multiplicação intracelular do parasita aumenta progressivamente, assim como a reação inflamatória, ambos os eventos a serem balanceados pela IL-10. 8. O TNF- $\alpha$  e o NO induzem a produção de PGE2, a qual regula negativamente o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ , enfraquecendo o controle da multiplicação dos parasitas.

## 2.7 POLIMORFISMOS DO GENE DO INTERFERON GAMA (*IFNG*)

O gene que codifica o INF- $\gamma$  se localiza no cromossomo 12q24.1, mede 5.4kb e contém éxons que codificam uma proteína de 146 aminoácidos. Vários polimorfismos de INF- $\gamma$  nas regiões não codificantes são descritos. A repetição do microssatélite CA na posição -179T/G tem sido implicada em numerosas doenças auto-imunes e condições inflamatórias crônicas (PRAVICA et al., 2000; CHONG et al., 2006; PACHECO et al., 2008). Um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP), localizado no primeiro íntron do gene de INF- $\gamma$  em humanos, junto a uma região de repetição CA (+874T/A) pode influenciar negativamente a secreção deste (PRAVICA et al., 2000).

É sabido que o INF- $\gamma$  participa de forma importante nas defesas do organismo contra patógenos intracelulares e contra vírus e na indução das respostas inflamatórias mediadas pela imunidade. Sabe-se que o polimorfismo T/A localizado na posição +874T *IFNG* pode geneticamente influenciar a produção de INF- $\gamma$  associada com o marcador microssatélite CA. Análise da sequência de mutação para o íntron do gene do *IFN- $\gamma$*  na posição +874 (tanto T ou A) gera três possíveis genótipos: A/A, T/A e T/T, os quais conferem 3 fenótipos relacionados à quantidade de interferon: baixo, intermediário e alto produtor, respectivamente.

Várias infecções virais, bacterianas e parasitárias estão associadas a variações no SNP +874T/A. A susceptibilidade a doenças como a síndrome respiratória aguda severa (SARS) (CHONG et al., 2006), hepatite B (CHEONG et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007), câncer cervical por HPV (GANGWAR et al., 2009), tuberculose (VALLINOTO et al., 2010) e toxoplasmose (ALBUQUERQUE et al., 2009) foi descrita com associação a este polimorfismo. Contudo, o polimorfismo do SNP na posição +874T/A não se mostrou associado a outras doenças como pancreatite crônica (BENDICHO et al., 2005), leishmaniose (MATOS et al., 2007), tuberculose (MORAN et al., 2007) e hepatite C (PEREIRA et al., 2008).

Por outro lado, doenças auto-imunes também podem ter sua ligação com o SNP +874T/A. Estudo em Lupus Eritematoso Sistêmico na população tailandesa demonstrou que a frequência alélica do polimorfismo no gene do *IFNG* +874 T/A entre pacientes portadores de Lupus e controles não foram significativamente diferentes. Entretanto, uma associação significativa ocorreu entre o alelo A no grupo dos pacientes portadores de Lupus e artrite, sugerindo que este polimorfismo pode ser usado como marcador para pacientes com Lupus e

susceptibilidade a artrite nesta população estudada (TANGWATTANACHULEEPORN et al., 2007).

Recentemente, foi publicado estudo em que foi feita análise da distribuição de alelos e genótipos no polimorfismo *IFNG* +874 T/A entre pacientes cardíacos e assintomáticos com doença de Chagas na população colombiana e não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos indicando que este polimorfismo não possui influência na progressão da doença de Chagas. Contudo, ao analisar pacientes soropositivos e soronegativos para o *T. cruzi* descreveu-se associação, sendo o genótipo AA mais frequente nos pacientes chagásicos, sugerindo, na opinião dos autores, susceptibilidade a doença (TORRES et al., 2010).

O papel dos polimorfismos no *IFNG* na susceptibilidade para a doença de Chagas e na progressão da cardiopatia chagásica crônica em nossa população ainda merece investigações. Considerando-se a escassez de pesquisas relacionando este polimorfismo com as formas clínicas da doença de Chagas, muita informação importante ainda está por ser produzida.

## 2.8 COMBINANDO TUDO: A IMUNIDADE NA DOENÇA DE CHAGAS

A eliminação de microrganismos patogênicos é eficazmente alcançada por dois ramos do sistema imunológico: "imunidade inata" e "imunidade adaptativa". As duas classes principais de células especializadas B e T (imunidade adaptativa) reconhecem antígenos não próprios via receptores únicos em sua superfície. Em resposta a uma grande variedade de antígenos potenciais, as células B e T reorganizam ambos os genes de imunoglobulinas e dos receptores das células T para gerar  $10^{14}$  e  $10^{18}$  receptores de antígenos diferentes, respectivamente. Em contraste com a imunidade adaptativa, a imunidade inata aparece precocemente durante a vida dos indivíduos e tem a capacidade de reconhecer microrganismos patogênicos por receptores codificados, com especificidades altamente definidas para estruturas conservadas presentes na maioria dos microrganismos patogênicos. Esta imunidade inata é ativada imediatamente após a infecção e rapidamente controla a replicação do microorganismo, até que a imunidade adaptativa assuma (TOUBI, E. & SHOELFELD, Y.; 2004).

Antes que a imunidade adquirida se estabeleça, o sistema imune inato parece ter participação em dois aspectos importantes da doença de Chagas: o controle da replicação do parasita com a disseminação entre tecidos do hospedeiro e a reação inflamatória nos tecidos

infectados, sabido como uma causa importante de dano e disfunção orgânica. Componentes clássicos da imunidade inata, como células dendríticas, macrófagos e células assassinas naturais (NK, do inglês *Natural Killer*) parecem ter papel crucial na imunidade contra o *T. cruzi* (JUNQUEIRA, C. et al.; 2010). Diferentes moléculas de superfície do parasito têm sido identificadas como indutoras da imunidade inata e mimetizadoras de receptores de membranas das células de defesa (GOLGHER, 2006).

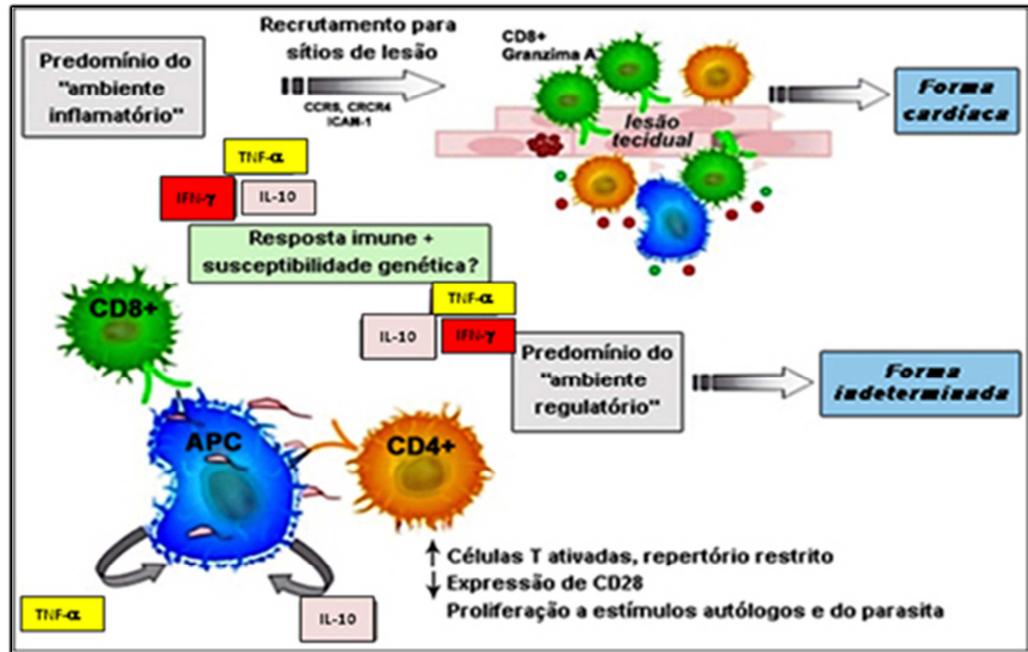
Alguns trabalhos têm descrito a participação da resposta imune do indivíduo frente ao parasito, sugerindo sua contribuição para a evolução da doença (BARROS-MAZON et al., 2004; GOMES et al., 2003), já que sua ativação é responsável pelo controle do parasita e é responsável pela reação inflamatória localizada em órgãos-alvo específicos (TEIXEIRA et al., 2002). Muitos são os mecanismos envolvidos que levam às formas graves da doença e sua morbidade. Já a ausência de sintomatologia pode estar associada com a capacidade individual de regular a resposta imune anti-*T. cruzi* (SOARES, 2012). Entretanto, devido à complexidade da resposta imunológica na doença de Chagas, esse processo pode também contribuir para os danos inflamatórios causados pela doença (BRENER; GAZZINELLI, 1997). Apesar da ação eficiente do sistema imune, aparentemente, o parasita persiste no organismo do paciente em baixos níveis na fase crônica da doença. Esse fato pode ser comprovado nos casos de pacientes imunodeprimidos ou em estados de imunossupressão, quando se observa um aumento da carga parasitária, caracterizando assim, uma reativação do parasitismo. O parasita persiste no hospedeiro na forma intracelular, já que estudos mostraram que células intensamente parasitadas por *T. cruzi* não são danificadas pelo infiltrado inflamatório durante a infecção (HIGUCHI et al., 1993).

Devido à complexidade dos mecanismos imunopatológicos da doença de Chagas e, conseqüentemente, os poucos conhecimentos para prever a evolução para as formas clínicas da doença, as células e as citocinas, poderiam ser a ligação para o estabelecimento de marcadores biológicos que auxiliassem no prognóstico das formas graves da doença. Neste contexto, o possível papel dos mecanismos imunes para o desenvolvimento das formas clínicas severas da doença de Chagas tem sido avaliado. Vários grupos de pesquisa têm buscado um padrão de resposta imune entre os pacientes chagásicos portadores das diferentes formas clínicas.

Ensaio de proliferação celular, utilizando células mononucleares de sangue periférico, foram realizados entre os pacientes portadores da doença de Chagas após estímulo com antígenos complexos de formas epimastigotas e tripomastigotas ou frações celulares do *T.*

*cruzi*. Diferenças na intensidade da resposta proliferativa entre a forma indeterminada e as formas sintomáticas foram demonstradas, sugerindo que este padrão de reatividade imune poderia estar relacionado com a patogenia das lesões tissulares na doença de Chagas (BARROS-MAZON et al., 2004; DE TITTO et al., 1985). Entretanto, outros estudos não encontraram diferenças nas respostas proliferativas entre os pacientes portadores da forma indeterminada e aqueles portadores das formas sintomáticas (GAZZINELLI et al., 1990; LORENA et al., 2008; MICHAILOWSKY et al., 2003; MORATO et al., 1986).

Estudos sobre a investigação de padrões de secreção de citocinas em células mononucleares de sangue periférico de pacientes chagásicos têm sido realizados utilizando antígenos complexos das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Esses trabalhos demonstraram que a IL-10 é a citocina secretada por pacientes portadores da forma indeterminada. Já os pacientes portadores das formas cardíacas têm maiores níveis de IFN- $\gamma$  (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; CORREA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003). Quando houve estimulação de células obtidas de PBMC com tripomastigotas vivos, observou-se que monócitos de pacientes com a forma indeterminada estão relacionados com a produção de IL-10, enquanto monócitos de pacientes com a forma cardíaca expressam TNF- $\alpha$ . Além disso, os elevados níveis de IFN- $\gamma$  estão correlacionados com o nível de severidade do envolvimento cardíaco, sugerindo que esta citocina poderia estar envolvida com a evolução clínica (SOUZA et al., 2004). Por outro lado, a IL-10 poderia estar associada com a proteção do hospedeiro portador da forma indeterminada contra o desenvolvimento das formas crônicas sintomáticas (GOMES et al., 2003). Diante desses achados, os autores sugeriram que pacientes portadores da forma indeterminada, que são capazes de manter baixos níveis de IFN- $\gamma$  e altos níveis de IL-10, poderiam não desenvolver a doença cardíaca (Figura 4).



**Figura 4:** Representação da participação das citocinas e microambientes com predomínio de inflamação ou tolerância com as formas clínicas. A predominância da produção de IFN- $\gamma$  promoveria inflamação e lesão cardíaca enquanto que a predominância da produção de IL-10 promoveria efeitos menos inflamatórios e pouca lesão cardíaca (Adaptado de MENEZES, 2013).

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica, produzida por diferentes células como macrófagos, células T, células B, mastócitos, queratinócitos e algumas células tumorais. Ela regula uma variedade de funções das células hemopoiéticas ao facilitar a eliminação de organismos infecciosos sem dano tissular. Além disso, desempenha importante função na tolerância imune, desenvolvimento de células T e dendríticas e no crescimento e diferenciação de células B (MOORE et al., 1990). Ela está também associada à susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (SILVA et al., 1992) devido, provavelmente, ao seu papel em regular a ativação de macrófagos induzida pelo IFN- $\gamma$ , inibindo tanto a liberação de metabólitos tóxicos quanto a diferenciação de células T helper tipo 1 (REED, 1988).

O TNF- $\alpha$  já foi identificado no miocárdio de cardiopatas chagásicos em estudos de imunohistoquímica e o seu aumento sérico tem sido associado à presença de cardiopatia dilatada. Esta associação provavelmente se relaciona com o fato dos pacientes cardiopatas montarem uma resposta com interferon gama mais intensa do que pacientes com a forma indeterminada. A produção predominante de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pelas células do infiltrado inflamatório de cardiopatas pode ser uma consequência direta da migração de linfócitos T observados no sangue periférico deste grupo de pacientes (REIS et al., 1993). Tais linfócitos

podem ter sido gerados na periferia após a interação com macrófagos que ao endocitar o *T. cruzi*, passaram a expressar moléculas coestimulatórias e produzir IL-12, um fenômeno possível de ocorrer na fase crônica da infecção.

Por sua vez a produção de óxido nítrico estaria diretamente relacionada com os níveis de IFN- $\gamma$ , uma vez que a síntese de NOSi é estimulada pela citocina em diversas situações imunológicas e precisão do reconhecimento inicial do patógeno pelo sistema imunológico é crucial para a produção de NO, de modo a montar uma resposta imune adequada (Figura 5). Durante a infecção pelo *T. cruzi*, o óxido nítrico pode, direta ou indiretamente, modular o mecanismo efetor dos leucócitos através de diversos mecanismos. Este processo envolve efeitos microbicidas derivados de radicais livres tóxicos (peroxinitrito e superóxido) gerados após a produção de NO, bem como de regulação/aumento da resposta inflamatória induzida durante este tipo de infecção, um duplo papel na imunidade que é normalmente observado para o NO. Esta dualidade imunológica é normalmente dependente da concentração deste e, uma vez desregulada, pode levar a toxicidade celular, autoimunidade ou persistência do parasita devido à evasão imune, as quais podem levar à patologia.

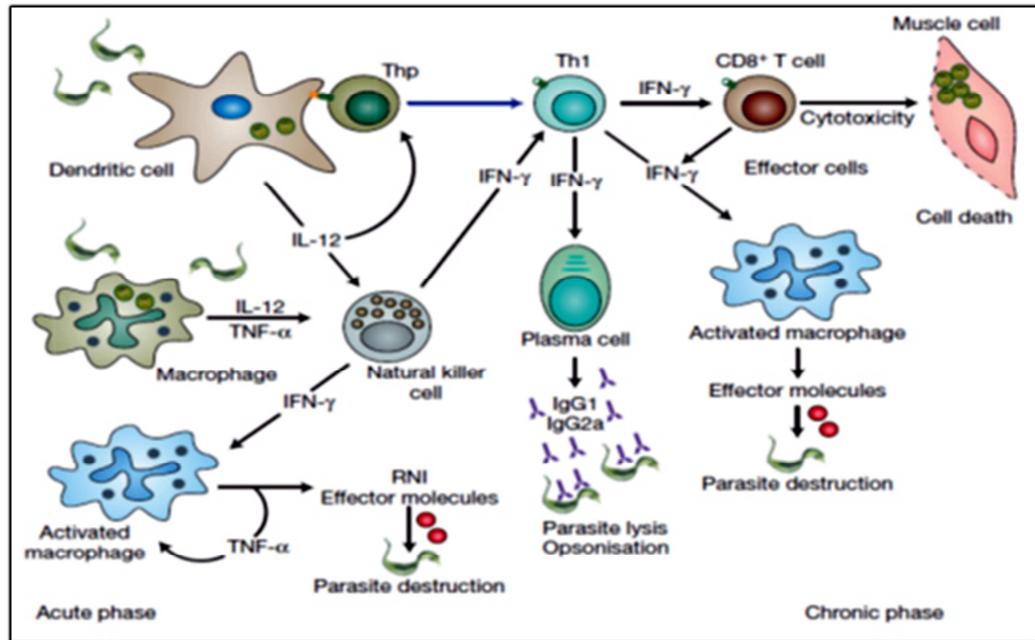


Figura 5: Imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Na fase inicial da infecção, a imunidade inata desempenha um papel crucial na resistência do hospedeiro à infecção: atuando como a primeira barreira, as células do sistema imune inato (macrófagos, células NK e células dendríticas) produzem citocinas (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), moléculas efetoras (NOS e GTPases induzidas por IFN) que controlam a replicação do parasita. Ao mesmo tempo, as células imunes inatas, particularmente células dendríticas, tornam-se ponte entre a imunidade inata e adquirida, ao produzir citocinas (IL-12) necessários para a diferenciação e expansão clonal dos linfócitos T helper 1 (Th1) CD4 +, bem como células T CD8+ e células B do sangue. O IFN- $\gamma$  produzido por linfócitos CD4+ Th1 ou células T CD8+ ativa os mecanismos efetores nos macrófagos para destruir os amastigotas e tripomastigotas fagocitados, enquanto a atividade citotóxica exibida por células T CD8+ destrói as células contendo amastigotas intracelulares. Os anticorpos produzidos por células B lisam as formas extracelulares do tripomastigota extracelular ou facilitam a fagocitose de parasitas opsonizados com IgG. (JUNQUEIRA et al, 2010).

### 3 OBJETIVOS

Descrever a prevalência dos polimorfismos dos genes *IFNG* +874 T/A e *NOS2A* -954G/C em uma população de pacientes na fase crônica da doença de Chagas.

Avaliar a existência de associação entre os polimorfismos e a presença ou não de cardiopatia chagásica crônica nestes pacientes.

Avaliar a existência de associação entre os polimorfismos e a gravidade da cardiopatia chagásica crônica nestes pacientes, considerando-se a gravidade baseada no consenso Brasileiro em doença de Chagas (estágios clínicos), na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, na presença ou não de alteração ecocardiográfica e na presença ou não de Insuficiência Cardíaca Congestiva;

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Este trabalho faz parte de um projeto amplo e multidisciplinar de pesquisa em doença de Chagas, iniciado em 1988 a partir da reestruturação do Hospital Evandro Chagas/Fundação Oswaldo Cruz, e da criação do Grupo de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas. A associação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) com o Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, permitiu a criação de um projeto interinstitucional, cujo principal objetivo foi realizar um estudo longitudinal da morbi-mortalidade da fase crônica da doença de Chagas em um grande centro urbano, através do acompanhamento de uma coorte de pacientes residentes na área metropolitana do Rio de Janeiro. O projeto “Identificação de marcadores imunogenéticos na evolução clínica para a doença de Chagas” surgiu como proposta para descrever mecanismos imunológicos que estariam ligados à evolução da cardiopatia Chagásica.

### **4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O projeto denominado “Identificação de marcadores imunogenéticos na evolução clínica para a doença de Chagas” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)/Fiocruz sob o número 0028.0.009.000-10 em 13 de agosto de 2010.

### **4.3 SELEÇÃO DE PACIENTES**

Os pacientes foram selecionados e incluídos consecutivamente, em uma amostra de conveniência, de forma a manter uma proporção semelhante entre o número de pacientes sem cardiopatia que se mantém em acompanhamento no IPEC e a proporção de pacientes cardiopatas em cada estágio do consenso Brasileiro em doença de Chagas (XAVIER, 2005).

### **4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Foram incluídos, no estudo, pacientes admitidos consecutivamente no período de novembro de 2007 a fevereiro de 2011. Pacientes, de ambos os sexos, com diagnóstico

sorológico positivo para a infecção pelo *T. cruzi*, com idade entre 18 e 75 anos, independente de classe, grupo social ou cor. Todos os pacientes tiveram seu diagnóstico sorológico confirmado no laboratório de Imunologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Todos os incluídos neste estudo foram selecionados da coorte do Laboratório de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas do IPEC/Fiocruz, após assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Apêndice A). Após uma entrevista onde um questionário clínico-epidemiológico foi respondido (Apêndice B), os pacientes foram submetidos à coleta sanguínea para determinação dos polimorfismos de interesse. Na semana da coleta foram submetidos a eletrocardiograma e ecocardiograma transtorácico.

#### 4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos indivíduos que apresentavam Diabetes Mellitus, disfunção tireoidiana, insuficiência renal, doença pulmonar obstrutiva crônica, alcoolismo, doença coronariana diagnosticada previamente, doença cardíaca reumática e HIV. Qualquer evidência de cardiopatia por causa não relacionada à doença de Chagas provocou exclusão do presente estudo.

#### 4.6 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos à pesquisa de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* no Setor de Imunodiagnóstico do IPEC/FIOCRUZ, através de três técnicas sorológicas distintas:

- a) hemaglutinação indireta: positiva em caso de títulos superiores a 1/64;
- b) imunofluorescência indireta: positiva em caso de títulos superiores a 1/80;
- c) teste imunoenzimático (ELISA, “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”): positiva quando superior a 1,2 (razão entre a densidade ótica e o valor limiar de reatividade).

O diagnóstico sorológico da doença de Chagas foi realizado quando pelo menos duas das três técnicas empregadas foram positivas. Em caso de resultados incongruentes ou limítrofes, novas amostras foram colhidas e testadas. Na persistência de resultados incongruentes, a prioridade foi dada ao resultado do teste de imunofluorescência indireta.

#### 4.7 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A avaliação clínica foi realizada no momento de inclusão no estudo. Anamnese dirigida, história epidemiológica e exame físico foram realizados com especial atenção à presença de sinais e sintomas cardiovasculares, de Insuficiência Cardíaca, relacionados à cardiopatia chagásica.

#### 4.8 AVALIAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA

Eletrocardiograma de doze derivações foi realizado na inclusão no estudo em todos os pacientes, em repouso, com um registro longo em D2 (30 segundos) para avaliação de arritmias. Os traçados foram analisados de forma independente por dois observadores. Em caso de discordância entre as duas análises (variação interobservador), um diagnóstico de consenso é obtido após discussão conjunta do traçado eletrocardiográfico. A análise eletrocardiográfica é realizada de forma cega, sem conhecimento de dados clínicos ou de outros métodos complementares. As alterações eletrocardiográficas são classificadas de acordo o código de Minnesota (PRINEAS, 1982), modificado para doença de Chagas (MAGUIRE et al., 1982).

#### 4.9 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA

Ecocardiograma uni e bidimensional com color Doppler foi realizado em todos os pacientes pelo mesmo ecocardiografista (autor da presente tese) na semana de inclusão ao estudo. O exame ecocardiográfico incluiu os cortes convencionais para-esternais, supra-esternais, apicais e subcostais e variações dos cortes convencionais, principalmente dos apicais, com objetivo de identificar alterações segmentares localizadas (geralmente pequenos aneurismas mamilares). A função sistólica global do VE foi avaliada de forma objetiva ao modo M, através do cálculo da FE (TEICHHOLZ et al., 1976), sendo classificada em: normal ( $FE \geq 55\%$ ), levemente deprimida ( $45\% \leq FE < 55\%$ ), moderadamente deprimida ( $35\% \leq FE < 45\%$ ) ou gravemente deprimida ( $FE < 35\%$ ). Devido ao caráter frequentemente segmentar da cardiopatia chagásica crônica (XAVIER, 1997), a função sistólica global do VE também foi avaliada ao bidimensional, de forma subjetiva, sendo classificada em normal, levemente, moderadamente ou gravemente deprimida (AMICO, 1989). Alterações segmentares

detectadas pela avaliação subjetiva também foram relatadas, sendo descritas como normal, hipocinesia para as hipocôntráteis, acinesia para as regiões sem espessamento sistólico durante o ciclo cardíaco e discinesia quando apresentavam movimento contrátil de abaulamento durante a sístole ventricular.

#### 4.10 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um estudo observacional, transversal em sua determinação da gravidade e dos polimorfismos de interesse quando da inclusão do indivíduo no estudo. No entanto, considerando-se que os polimorfismos são marcadores que já estão expressos desde o nascimento do indivíduo, o presente estudo fornece uma informação longitudinal, já que permite relacionar a evolução da doença a um marcador que embora identificado agora, já estava comprovadamente presente antes da infecção.

Na grande maioria dos pacientes com doença de Chagas não é possível determinar o momento da infecção, já que a doença aguda geralmente não é diagnosticada. Desta forma, informação exata sobre o tempo de doença não é disponível ou confiável. O parâmetro que provavelmente mais se aproxima ou reflete o tempo de doença é a idade, já que em áreas endêmicas a infecção geralmente ocorre na infância ou início da adolescência.

A coorte acompanhada no IPEC é constituída por pacientes com décadas de evolução da doença (a considerar pela idade) e que em sua grande maioria estão afastados da área endêmica há muitos anos e, portanto, livre de reinfecções pelo *T. cruzi*.

#### 4.11 DEFINIÇÕES

a) Cardiopatia: Presença de alterações no eletrocardiograma ou no ecocardiograma consideradas definidoras de lesão cardíaca pela doença de Chagas, segundo o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (CBDC) (BRASIL, 2005), e que serão denominados cardiopatas chagásicos crônicos (CCC) no texto a seguir.

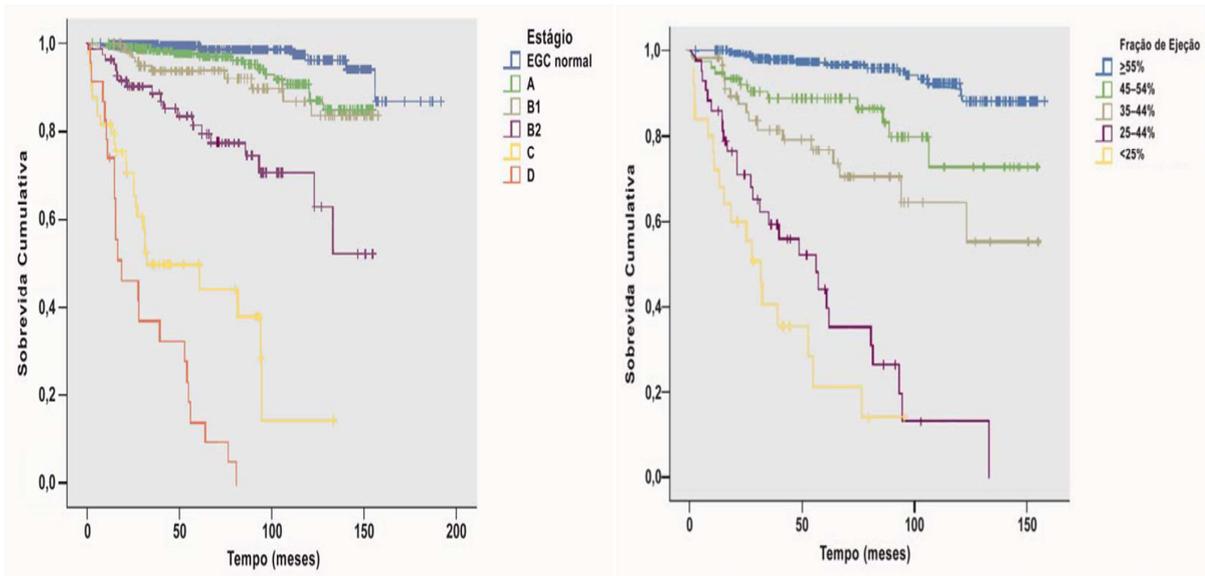
b) Ausência de cardiopatia aparente: Pacientes com sorologia positiva para doença de Chagas e normalidade ao exame clínico, eletrocardiográfico e ecocardiográfico. Doravante descritos como não cardiopatas (NC).

c) Estágios Clínicos: Baseando-se no Consenso Brasileiro em doença de Chagas (BRASIL, 2005), os pacientes crônicos podem ser divididos entre sem cardiopatia aparente e cardiopatas. Os cardiopatas podem ser subdivididos em estágio A (ECG alterado e ECO normal), B1 (ECG alterado e ECO alterado, porém com FE>45%), B2 (ECG alterado e ECO alterado, porém com FE < 45%; e sem insuficiência cardíaca), C (ECG e ECO alterados, com insuficiência cardíaca compensável) e D (ECG e ECO alterados, com insuficiência cardíaca refratária).

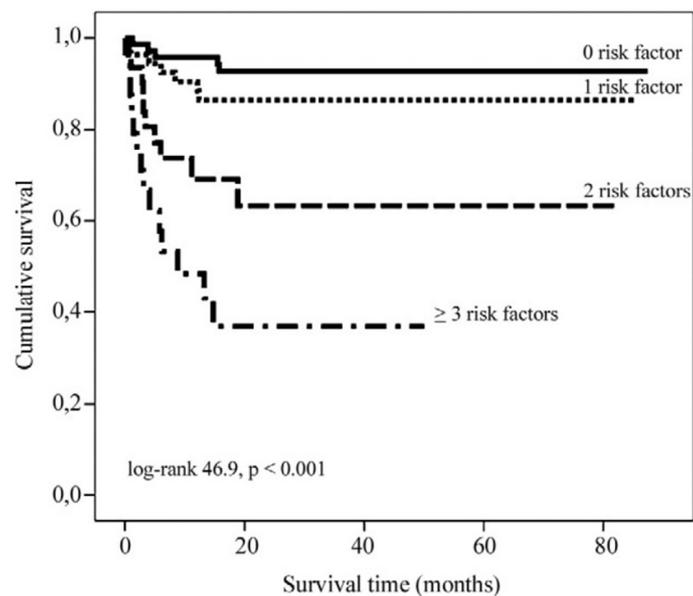
d) Insuficiência Cardíaca: A associação de um ou mais sinais e sintomas com a presença de disfunção ventricular ao ecocardiograma classificou o paciente como portador de Insuficiência Cardíaca. Sinais como dispneia, ortopnéia, dispneia paroxística noturna, tolerância reduzida aos exercícios, fadiga, edema perimaleolar ou de membros e sintomas como elevação da pressão venosa central, presença de refluxo hepatojugular, presença de terceira bulha – B3, desvio do ictus cordis para a linha hemiclavicular esquerda e crepitações pulmonares foram objetivamente questionados e procurados no momento de inclusão do paciente (EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY, 2008).

e) alterações ao ecocardiograma: Alterações da contratilidade miocárdica ao ecocardiograma, compatíveis com CCC: alterações difusas ou segmentares (hipocontratilidade, acinesia ou discinesia), aumento dos diâmetros do VE, disfunção contrátil do VE, aneurismas apicais, disfunção contrátil do ventrículo direito. (ACQUATELLA, 2007).

f) marcadores de gravidade: Escolhidos dentre parâmetros definidores de mortalidade e/ou de eventos cardíacos em cardiopatia chagásica (Figuras 5 e 6) (XAVIER, 2005; RASSI JR, 2007; XAVIER et al.; 2007; ROCHA, 2009). Fração de ejeção, presença de insuficiência cardíaca, presença ou não de alterações ecocardiográficas e estágios clínicos pelo Consenso Brasileiro de doença de Chagas serão propostos como marcadores de gravidade dos pacientes participantes deste estudo.



**Figura 6:** Curvas de sobrevida estratificado pela classificação do Consenso Brasileiro em doença de Chagas e pela fração de ejeção do VE. Modificado de XAVIER, 2007.



**Figura 7:** Curva de Kaplan Meier demonstrando a sobrevida cumulativa livre de eventos cardíacos em pacientes com CCC de acordo com o número de fatores de risco ecocardiográficos (parâmetros alterados no ecocardiograma) (ROCHA, 2009).

## 4.12 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO *IFNG* +874 T/A

### 4.12.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foi obtida uma única amostra de sangue no momento da inclusão dos pacientes. Cinco mililitros de sangue total em EDTA (Vacuntainer) foram coletados em acesso venoso periférico, aliquotados e armazenados imediatamente em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso para extração do DNA genômico.

### 4.12.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA genômico foram utilizados 200  $\mu\text{L}$  da alíquota do sangue total em EDTA previamente descongelado. Utilizou-se o QIAmp DNA blood mini kit (Qiagen). A metodologia utilizada para a extração do DNA genômico seguiu o protocolo descrito pelo fabricante: 20  $\mu\text{L}$  da proteinase Qiagen foi adicionada a um tubo de 1,5 mL tipo eppendorf, previamente rotulado com o número da amostra. Adicionou-se a estes tubos, 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra de sangue, seguido de 200  $\mu\text{L}$  do tampão AL, do próprio Kit. Os tubos foram homogeneizados em vortex por 15 segundos. A amostra foi incubada a  $56^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e centrifugada até 10.000 rotações por minuto, quando o processo era imediatamente interrompido. Um total de três repetições foi feito, para remover os possíveis resíduos da tampa. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de etanol (96 a 100%, marca Merck) e homogeneizado em vortex por 15 segundos. A amostra foi novamente centrifugada a 10.000 rpm, rapidamente, como anteriormente descrito, para remover os possíveis resíduos da tampa. A seguir, a amostra foi cuidadosamente transferida para a coluna QIAmp e a mesma centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi novamente transferida para outro tubo de 2 mL (incluso no kit) e o filtrado descartado. Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  do tampão AW1 (incluso no kit) e centrifugou-se a 8.000rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi transferida para outro tubo de 2 mL (incluso no kit) e o filtrado descartado. Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  do tampão AW2 e centrifugou-se a 14.000rpm por 3 minutos. A coluna QIAmp foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL (sem tampa) e o filtrado descartado. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do tampão AE (do Kit), incubando-se a temperatura ambiente ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) por 1 minuto e então centrifugou-se a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna QIAmp foi descartada. O filtrado foi

transferido para um eppendorf de 1,5 mL e o DNA genômico foi acondicionado em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Dez microlitros de cada amostra de DNA foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) a 1%, em tampão TBE 1X, a 60 V, a fim de verificar a presença de banda única no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen). O DNA genômico foi corado em uma solução de Brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado em luz ultravioleta através do transiluminador (UVP).

#### 4.12.3 DEFINIÇÃO DO POLIMORFISMO DE *IFNG* +874T/A

Os polimorfismos foram determinados através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). Para a determinação dos polimorfismos de *IFNG* +874T/A foi utilizada a técnica de ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System), como uma técnica para a análise de uma mutação pontual ou uma pequena deleção. O PCR ARMS típico que é capaz de detectar um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) consiste em duas reações complementares: uma contendo um primer específico para a sequência normal do DNA e incapaz de amplificar o DNA mutante no locus e outro contendo um primer mutante específico que não amplifica o DNA normal. O genótipo de um indivíduo pode ser determinado pela análise da amplificação de seus produtos, onde o DNA genômico é amplificado a partir de uma Taq DNA polimerase (GoTaq® Polymerase - Promega, USA) em duas reações de PCR para cada polimorfismo. Cada reação ocorre com um primer antisense genérico e um de dois primers sensores alelo específicos. Como controle interno da amplificação em ambas as reações foi utilizado um par de primers desenhados a partir da sequência nucleotídica do hormônio de crescimento humano de 426 bp. Nesta técnica para cada citocina é identificada a região que contém o polimorfismo e as bases nucleotídicas que sofrem mutação. Para o polimorfismo de *IFNG* na posição +874T/A foram utilizados um primer genérico e dois primers específicos T e A:

Primer genérico: 5' – TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA – 3'

Primer específico T: 5'- TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT - 3'

Primer específico A: 5'- TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA - 3'

O primer iniciador utilizado para a amplificação do controle interno dessa citocina foi:

CTI1: 5' - TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C - 3'

CTI 2: 5' - GCC TTC CAA CCATTC CCT TA - 3'

O fragmento do DNA genômico foi amplificado por PCR utilizando termociclador GeneAmp 9700 Applied Biosystem de acordo com o protocolo já estabelecido no laboratório seguindo o protocolo ( PRAVICA et al., 2000) com volume final de 20  $\mu\text{L}$  (18,0  $\mu\text{L}$  mix + 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA genômico).

Para cada amostra de DNA foi preparado um mix contendo 1,0  $\mu\text{L}$  de Primer genérico (100 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 1,0  $\mu\text{L}$  de primer específico A ou T (100 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 1,0  $\mu\text{L}$  de controle interno 1 (10 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 1,0  $\mu\text{L}$  de controle interno 2 (10 pmol/  $\mu\text{L}$ ), 4,0  $\mu\text{L}$  de dNTP (2 mM, Invitrogen), 2,4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM, Kit Hot Star Qiagen), 3,0  $\mu\text{L}$  de Tampão (10X, Kit Hot Star Qiagen), 0,5  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5U/  $\mu\text{L}$ , Kit Hot Star Qiagen), 4,1  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ estéril. O volume final do mix foi de 18,0  $\mu\text{L}$  sendo adicionado 2,0  $\mu\text{L}$  DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 20  $\mu\text{L}$ . A PCR foi realizada no Termociclador (Applied Biosystems). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 95°C (3 minutos), 10 ciclos de 95°C (15 segundos), 65°C (50 segundos) e 72°C (40 segundos) seguidos por 20 ciclos de 95°C (20 segundos), 55°C (50 segundos) e 72°C (50 segundos), 72°C (7 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

#### 4.12.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Amersham) 1,5 %, utilizando TBE 1X. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O DNA foi corado em uma solução de brometo de etídio (10mg/mL) e visualizado em luz ultravioleta em transluminador. As imagens foram capturadas usando um sistema de captura de imagem (Figura 8).



**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose das bandas representativas do polimorfismo do gene *IFNG* +874T/A.

#### 4.13 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO DO *NOS2A* -954G/C

Para a análise do polimorfismo para o *NOSi* na posição -954G/C, seguiu-se protocolo já descrito previamente (KUN et al., 2001), tendo sido realizado o RFLP-PCR. Para esta técnica é necessária a preparação de um mix contendo todos reagentes utilizados.

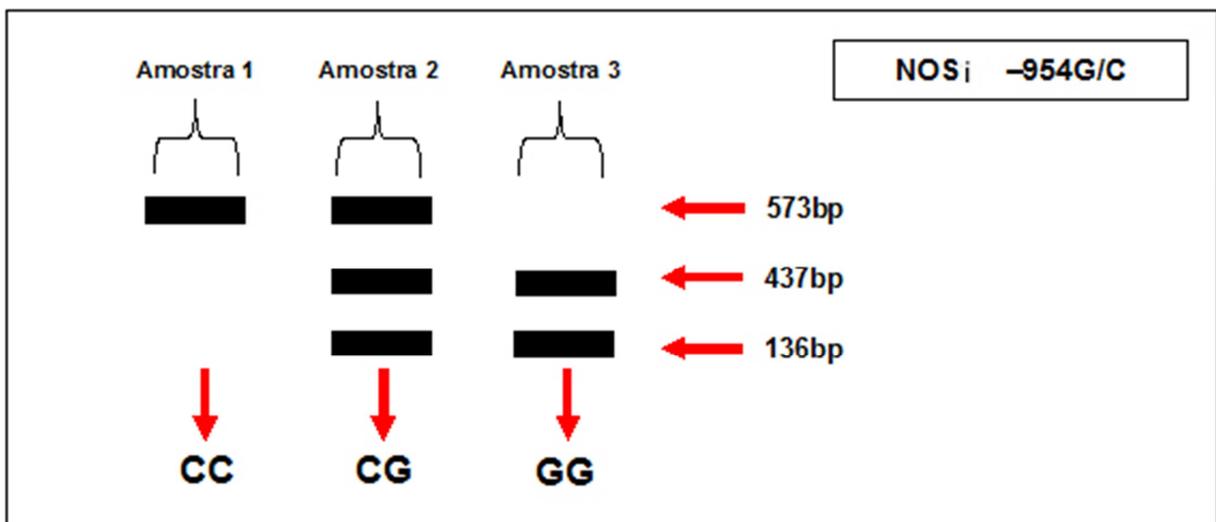
Para o PCR de amostra, foram utilizados os seguintes reagentes no preparo do mix: 0,2μL do Forward primer (100 pmol/μL, Invitrogen), 0,2μL do Reverse primer (100 pmol/μL, Invitrogen), 4μL de dNTP (2 mM, GE Healthcare), 3,2μL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Invitrogen), 5μL de Tampão (10X, Invitrogen), 0,3μL de Taq DNA polimerase (5U/μL, Invitrogen), 5,1μL de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril. O volume final do mix foi de 18μL sendo adicionado 2μL DNA genômico da amostra a ser processada. O volume final da reação foi de 20μL. A PCR foi realizada no Termociclador (TC-3000, Techne). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 92°C (3 minutos), 40 ciclos de 92°C (30 segundos), 60°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto), 72°C (7 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 1%, utilizando TBE 1X (Invitrogen), a 60 V, a fim de verificar a presença de banda única no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen).

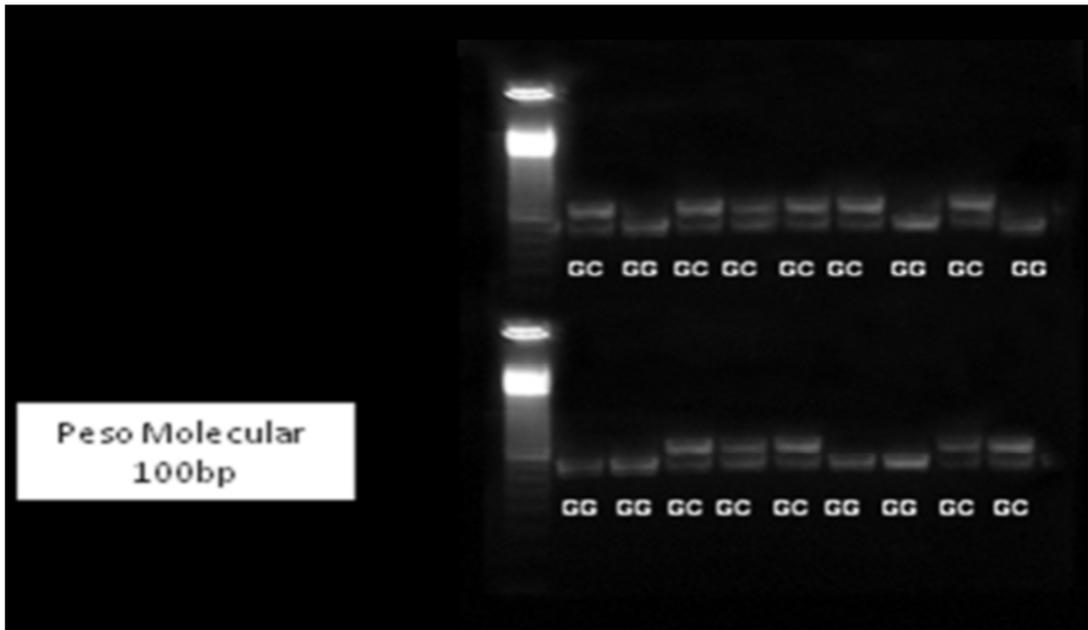
O produto do PCR foi corado com Blue green loading die 1 (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP).

Após a verificação da amplificação do PCR, foi realizada a digestão enzimática com BsaI (New England BioLabs), seguindo o seguinte protocolo na preparação do Mix: 3,5µL do tampão 10X (NE Buffer 3), 0,5µL da enzima BsaI e 6µL de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril. O volume final do Mix foi de 10µL. Ao Mix foi adicionado 10µL do produto de PCR. A digestão foi realizada no Termociclador (TC-3000, Techne). Os ciclos utilizados foram os seguintes: 50°C (60 minutos), 65°C (20 minutos) e 4°C (temperatura de finalização).

A amplificação do fragmento foi confirmada em corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen) 3%, utilizando TBE 1X (Invitrogen), a 60 V, a fim de verificar a presença de banda no gel. Foi usado o marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen). O produto da digestão foi corado com Blue green loading die 1 (LGC Biotecnologia) e visualizado sob luz ultravioleta através do Transiluminador (UVP). A Figura 9 ilustra o resultado da digestão visualizada no gel de eletroforese e a Figura 10 mostra resultado como visualizado após eletroforese.



**Figura 9:** Esquema do resultado visualizado no gel de eletroforese a 3%, sob luz ultravioleta, do polimorfismo para *NOS2A* -954G/C.



**Figura 10:** Resultado visualizado após eletroforese, sob luz ultravioleta, do polimorfismo para *NOS1* -954G/C.

#### 4.14 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

A casuística foi testada quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg sendo esta enquadrada dentro dos padrões de equilíbrio determinado pelo mesmo.

Os dados foram analisados para a população geral no intuito de determinar a frequência de cada genótipo, bem como através da análise entre indivíduos não cardiopatas (NC) e com cardiopatia (CCC). Foi utilizado o programa estatístico SPSS (Statistical package for the social Science) versão 20.0 para a determinação exata das frequências dos genótipos de todos os polimorfismos realizados neste estudo.

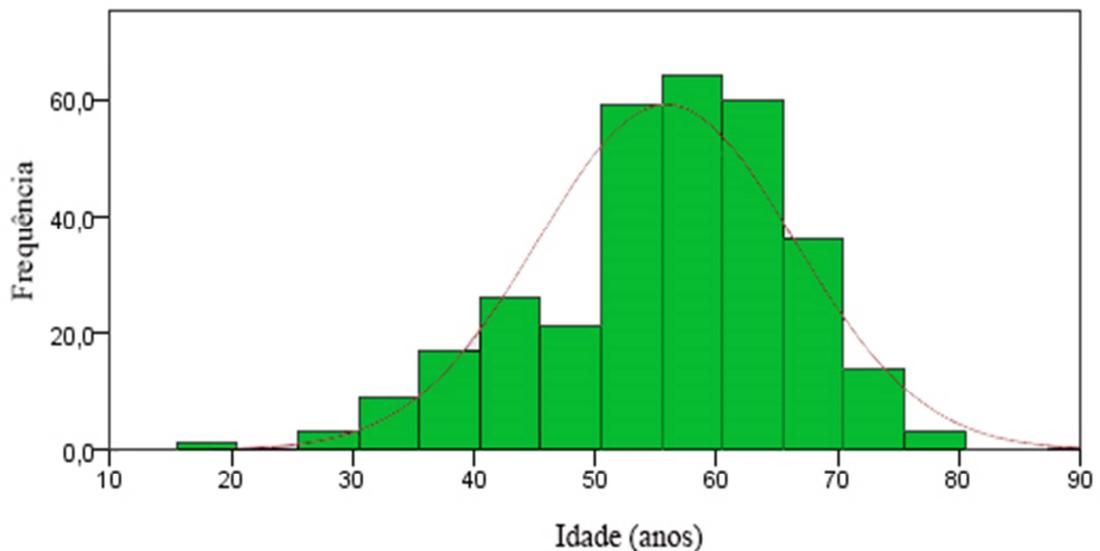
A frequência dos polimorfismos estudados foi descrita e avaliada pela análise dos genótipos pela contagem em tabelas de contingência 2x2, em modelo de co-dominância e dominância. As distribuições dos polimorfismos foram então comparadas às distribuições pelos dados epidemiológicos, pelos dados da ecocardiografia, pela presença ou não de insuficiência cardíaca e pela classificação do Consenso Brasileiro em doença de Chagas, em tabelas 2x2 ou 3x2, pelo teste do qui-quadrado, qui-quadrado *for trend* ou teste exato de Fisher, quando indicado.

É necessário acrescentar que foi utilizado o teste de Kolmogorov-Sminorv para testar o padrão de distribuição das variáveis numéricas e que na presença de distribuição assimétrica da fração de ejeção foram utilizados testes não paramétricos (Mann Whitney U e Kruskall Wallis) para comparar esta variável nos grupos de polimorfismos.

## 5 RESULTADOS

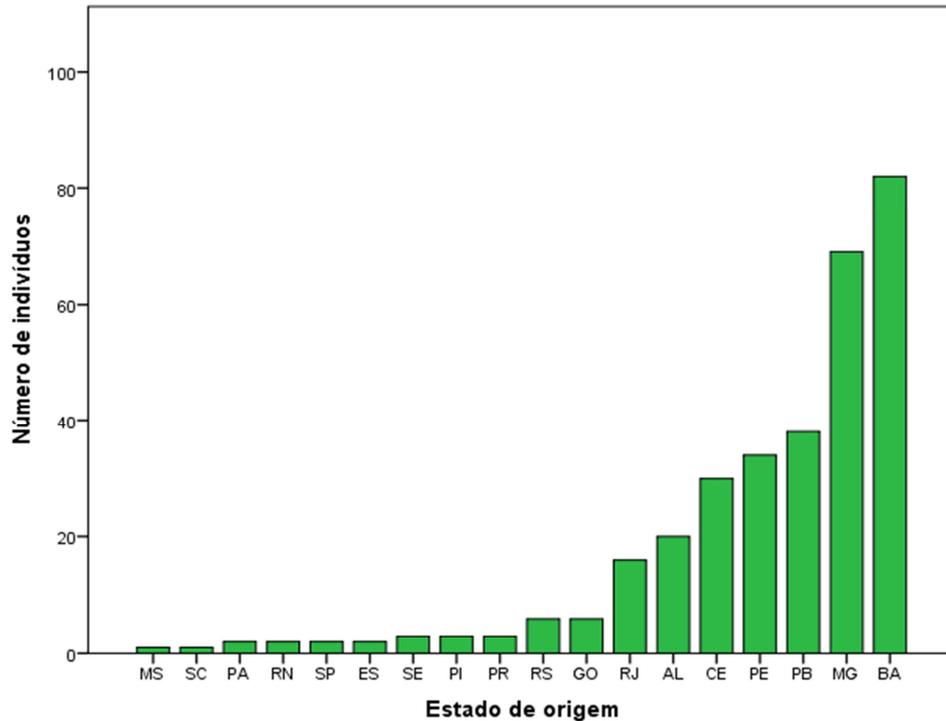
### 5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO GERAL E DOS GRUPOS CARDIOPATA E NÃO CARDIOPATA

No total, 313 pacientes participaram do presente estudo, sendo 56,9% do sexo feminino e 43,1% do sexo masculino. A média da idade da amostra populacional foi de  $55,8 \pm 10,6$  anos, variando entre 18 e 80 anos (Figura 10/Tabela 1). Do total de pacientes, 143 eram cardiopatas (CCC) e 170 não cardiopatas (NC). A média da idade foi diferente estatisticamente entre os grupos cardiopata e não cardiopata (CCC: 54,2 vs NC: 57,8 –  $p=0,003$ ), com idade mais elevada no grupo cardiopata. Em relação ao percentual de homens e mulheres em cada grupo não houve diferença estatística entre eles ( $p>0,05$ ).



**Figura 11: Representação gráfica da distribuição da idade dos pacientes participantes do estudo.**

Em relação à naturalidade dos pacientes, observou-se maior frequência de pacientes provenientes da Bahia (79 – 25,2%) e Minas Gerais (68 – 21,7%), seguidos dos estados do nordeste e norte brasileiro [Paraíba (36 – 11,5%), Pernambuco (34 – 10,9%) e Ceará (30 – 9,6%)] (Figura 11/Tabela 1).



**Figura 12: Distribuição dos estados de origem dos pacientes participantes do estudo.**

A distribuição dos pacientes de acordo com o tempo de afastamento de seus estados de origem mostra que a maioria – quase 90% em ambos os grupos - têm mais de 31 anos de afastamento das áreas consideradas endêmicas (Tabela 1) e mesmo a minora está afastada a mais de 10 anos destas áreas.

Nesta amostra populacional, a transmissão vetorial foi a mais frequente (95,2% dos pacientes) sobre outras formas de transmissão. Ressalta-se a presença de um único indivíduo em que houve confirmação de transmissão vertical (0,3% dos casos). Os demais foram infectados através da via transfusional (4,5%).

**Tabela 1: Dados epidemiológicos, do eletrocardiograma e do ecocardiograma dos grupos CCC e NC.**

	CCC (143)	NC (170)	<i>p</i>
Idade ± DP <sup>1</sup> (anos)	57,8 ± 9,7	54,2 ± 11,2	<i>p</i> =0,003
<b>Sexo</b>			
Masculino	59 (41,3%)	76 (44,7%)	NS <sup>2</sup>
Feminino	84 (58,7%)	94 (55,3%)	
<b>Naturalidade</b>			
Minas Gerais	33 (23,1%)	35 (20,6%)	
Bahia	32 (22,4%)	47 (27,6%)	NS
Pernambuco	18 (12,6%)	16 (9,4%)	
Paraíba	16 (11,2%)	20 (11,8%)	
<b>Tempo de afastamento (anos)</b>			
<10	0	1 (0,6%)	
11-20	5 (3,5%)	7 (4,1%)	
21-30	10 (7,0%)	11 (6,5%)	NS
>31	128 (89,5%)	151 (88,8%)	
<b>Fração de Ejeção do VE</b>			
Média ± DP	54,7 ± 14,9	66,4 ± 5,1	<i>p</i> <0,0001
Normal	89 (62,2%)	170 (100%)	
Leve	19 (13,3%)	0	
Moderada	15 (10,5%)	0	
Grave	20 (14,0%)	0	
<b>Achados no ECG</b>			
HBAE/BRD3G <sup>3</sup>	63 (44,0%)	0	<i>p</i> <0,05
BRD3G <sup>4</sup>	44 (30,8%)	0	
HBAE <sup>5</sup>	28 (19,6%)	0	
BAV1G <sup>6</sup>	28 (19,6%)	0	
ESV <sup>7</sup>	26 (18,2%)	0	
ALT. REPOLARIZ. <sup>8</sup>	17 (11,9%)	0	
RITMO MP <sup>9</sup>	16 (11,0%)	0	
ZEI <sup>10</sup>	7 (4,9%)	0	

<sup>2</sup>: desvio padrão; <sup>3</sup>: não significativo; <sup>4</sup>: associação hemibloqueio anterior esquerdo e bloqueio de ramo direito do terceiro grau; <sup>5</sup>: bloqueio de ramo direito do terceiro grau; <sup>6</sup>: hemibloqueio anterior esquerdo; <sup>7</sup>: bloqueio átrio ventricular do primeiro grau; <sup>8</sup>: extrassístole ventricular isolada; <sup>9</sup>: alteração difusa da repolarização ventricular; <sup>10</sup>: ritmo de marcapasso definitivo; <sup>10</sup>: zona elétrica inativa.

No grupo CCC, as alterações mais frequentemente observadas ao ECG foram as associações entre hemibloqueio anterior esquerdo e bloqueio de ramo direito do terceiro grau (44% dos pacientes cardiopatas) seguido das presenças isoladas de bloqueio do ramo direito do terceiro grau (30,8%) e hemibloqueio anterior esquerdo (19,6%). Como era de se esperar, a média da fração de ejeção foi maior no grupo NC, com diferença estatística entre eles ( $p < 0,0001$ ). No grupo CCC, a maior frequência foi de pacientes com fração de ejeção normal (89 - 62,2%), com frações de ejeção progressivamente menores conforme o estágio clínico (Tabela 2).

**Tabela 2: Características epidemiológicas e dados do ecocardiograma dos pacientes do grupo cardiopata dividido por estágios clínicos do consenso Brasileiro em doença de Chagas.**

	A <sup>2</sup>	B1 <sup>3</sup>	B2 <sup>4</sup>	C <sup>5</sup>	D <sup>6</sup>	p
	n= 64	n= 44	n=7	n=17	n=11	
<b>Idade</b> ± DP <sup>1</sup>	57,7 ± 10,4	58,4 ±	59,1 ± 4,3	57,8 ± 6,7	55,3 ± 10,2	NS
<b>Sexo (M/F)</b>	21/43	21/23	5/2	8/9	4/7	NS
<b>Função sistólica</b>						
<b>FE ± DP<sup>1</sup></b>	64,9 ± 6,2	57,8 ± 8,2	39,9 ± 1,9	33,8 ± 5,8	25,6 ± 4,8	$p < 0,001$
<b>Normal</b>	64	25	0 (0,0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Leve</b>	0	19 (43,2)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
<b>Moderada</b>	0	0 (0,0%)	7 (100,0%)	8 (47,1%)	0 (0,0%)	
<b>Grave</b>	0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	9 (52,9%)	11	

<sup>1</sup>: desvio padrão; <sup>2</sup>: ECG alterado com ECO normal; <sup>3</sup>: ECG e ECO alterados, com fração de ejeção do VE maior que 45%; <sup>4</sup>: ECG e ECO alterados, com fração de ejeção do VE menor que 45%; <sup>5</sup>: ECG e ECO alterados com Insuficiência cardíaca compensada; <sup>6</sup>: Insuficiência cardíaca não controlada ou manifesta. NS – não significativo – ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 FREQUÊNCIAS DA DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS NA POPULAÇÃO

Na Tabela 3 encontram-se as frequências dos polimorfismos para o *IFNG* +874 T/A e do *NOS2A* -954 G/C. Na contagem absoluta, para o *IFNG* +874 T/A, o genótipo TA foi mais prevalente (44,1%) do que o genótipo AA (42,2%) e o TT (13,7%). Já para o *NOS2A* -954 G/C a maior prevalência se deu para o genótipo GG (94,5%) em comparação com os genótipos GC (5,1%) e CC (0,3%). A distribuição dos genótipos segue o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 3: Frequência dos polimorfismos do *IFNG* +874 T/A e *NOS2A* -954 G/C na população do estudo.**

	Polimorfismo <i>IFNG</i> +874 T/A	Polimorfismo <i>NOS2A</i> -954G/C
<b>AA</b>	132 (42,2%)	<b>GG</b> 296 (94,6%)
<b>AT</b>	138 (44,1%)	<b>GC</b> 16 ( 5,1%)
<b>TT</b>	43 (13,7%)	<b>CC</b> 1 ( 0,3%)

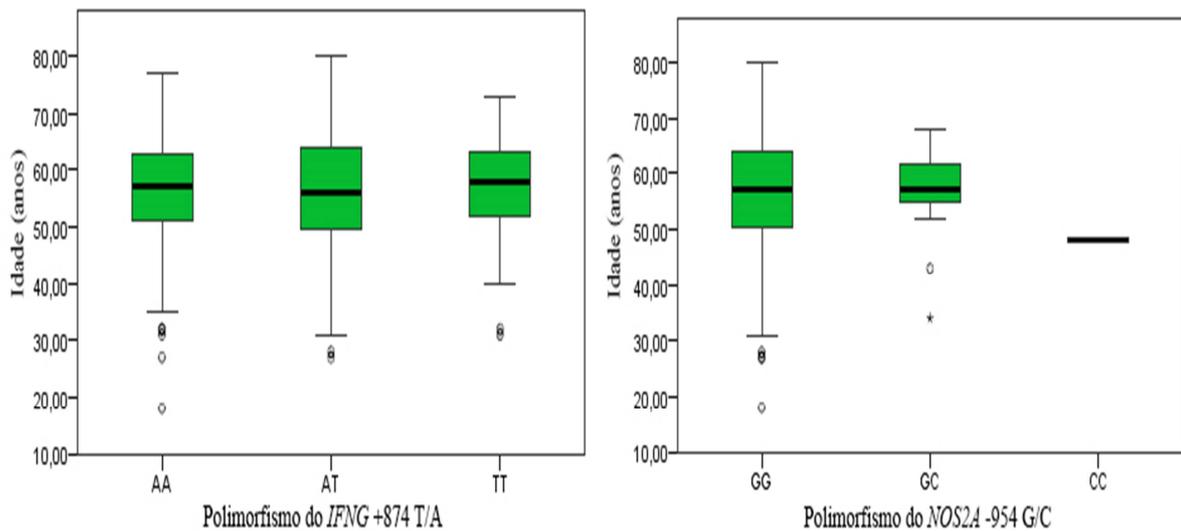
Ao se agrupar os pacientes pelos polimorfismos, não se observou diferenças entre os grupos com base na idade, sexo e naturalidade (Tabela 4).

**Tabela 4: Dados das frequências das características epidemiológicas da amostra populacional quando estratificada pelos polimorfismos analisados.**

		Polimorfismo <i>IFNG</i> +874 T/A			<i>p</i>	Polimorfismo <i>NOS2A</i> -954 G/C			<i>p</i>
		AA	AT	TT		GG	GC	CC	
Sexo	♂	58 (43,9)	61 (44,2)	16 (37,2)	NS	127 (42,9)	8 (50)	1 (100)	NS
	♀	74 (56,1)	77 (55,8)	27 (62,8)	NS	169 (57,1)	8 (50)	0	NS
Naturalidade	BA	42 (31,8)	27 (19,6)	10 (23,3)	NS	76(25,7)	2 (12,5)	1 (100)	NS
	MG	22 (16,7)	35 (25,4)	11 (25,6)	NS	62 (20,9)	6 (37,5)	0	NS
	PB	13 (9,8)	16 (11,6)	7 (16,3)	NS	33 (11,1)	3 (18,8)	0	NS

Dados expressos como frequências e entre parênteses valores porcentuais (%); ♂=sexo masculino; ♀=sexo feminino. NS- não significativo ( $p>0,05$ ).

A idade foi testada quanto à sua distribuição, e a mesma não segue os parâmetros de normalidade. Não houve diferença estatística quando a idade é analisada para avaliar diferenças quanto aos polimorfismos do *IFNG* +874 T/A e do *NOS2A* -954 G/C (Figura 12).



**Figura 13: Representação da distribuição da idade para os polimorfismos pesquisados. À esquerda representação do *IFNG* +874 T/A com  $p=0,937$  e à direita representação do *NOS2A* -954 G/C com  $p=0,601$ .**

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS E CARDIOPATIA

#### 5.3.1 PARA *IFNG* +874 T/A

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o polimorfismo do *IFNG* +874 T/A (Tabela 5). O genótipo TT é encontrado de forma mais frequente nos pacientes não cardiopatas, mas com um valor limítrofe de significância (0,06).

**Tabela 5: Frequências dos genótipos para o *IFNG* +874T/A entre CCC e NC.**

<i>IFNG</i> +874 T/A	CCC	NC
AA	67 (46,9%)	65 (38,2%)
AT	61 (42,7%)	77 (45,3%)
TT	15 (10,5%)	28 (16,5%)

$\chi^2$  for trend=3,45 –  $p = 0,06$

#### 5.3.1.1 ANÁLISE DE DOMINÂNCIA PARA OS POLIMORFISMOS DO *IFNG* +874 T/A

A análise da frequência genotípica no modelo de dominância dos genótipos para o *IFNG* +874T/A mostra a ausência de diferença estatística quando os genótipos AA ( $p = 0,077$ ) ou TT ( $p = 0,085$ ) estão em dominância (Tabela 6).

**Tabela 6: Frequências dos genótipos do *IFNG* +874T/A para análise de dominância.**

Dominância	CCC	NC
<b>AA vs.</b>	67	65
<b>AT + TT</b>	76	105
$\chi^2=2,37 - p = 0,12$ OR=1,42[0,88-2,29]		
<b>TT vs.</b>	15	28
<b>AT + AA</b>	128	142
$\chi^2=2,34 - p = 0,12$ OR=0,59 [0,29-1,22]		

### 5.3.2 PARA O *NOS2A* -954 G/C

A comparação entre os polimorfismos mostra maior frequência dos polimorfismos GC e CC nos cardiopatas e do GG nos não cardiopatas, com diferença estatística (Tabela 7). Se o único indivíduo com genótipo CC for retirado da análise, a diferença se situa na região limítrofe da significância.

**Tabela 7: Frequências dos genótipos para o *NOS2A* -954 G/C entre os grupos CCC e NC.**

<i>NOS2A</i> -954G/C	CCC	NC
GG	131 (91,6%)	165 (97,1%)
GC	11 (7,7%)	5 (2,9%)
CC	1 (0,7%)	0

$\chi^2=4,83 - p = 0,02 - \text{OR} [1,00-2,77]$ . Se o indivíduo CC for retirado,  $\chi^2=3,67 - p = 0,055$ .

#### 5.3.2.1 ANÁLISE DE DOMINÂNCIA PARA OS POLIMORFISMOS DO *NOS2A* -954 G/C

A análise de dominância de genótipos para o *NOS2A* -954 G/C mostra que quando o genótipo os genótipos GC e CC são agrupados pelo efeito de codominância, há diferença estatística ( $p=0,034$ ) (Tabela 8). Não foi possível estimar a significância da diferença para a dominância do genótipo CC pelo fato de que somente um indivíduo apresentou este genótipo em toda a casuística.

**Tabela 8: Frequências dos genótipos do *NOS2A* -954G/C para análise de dominância.**

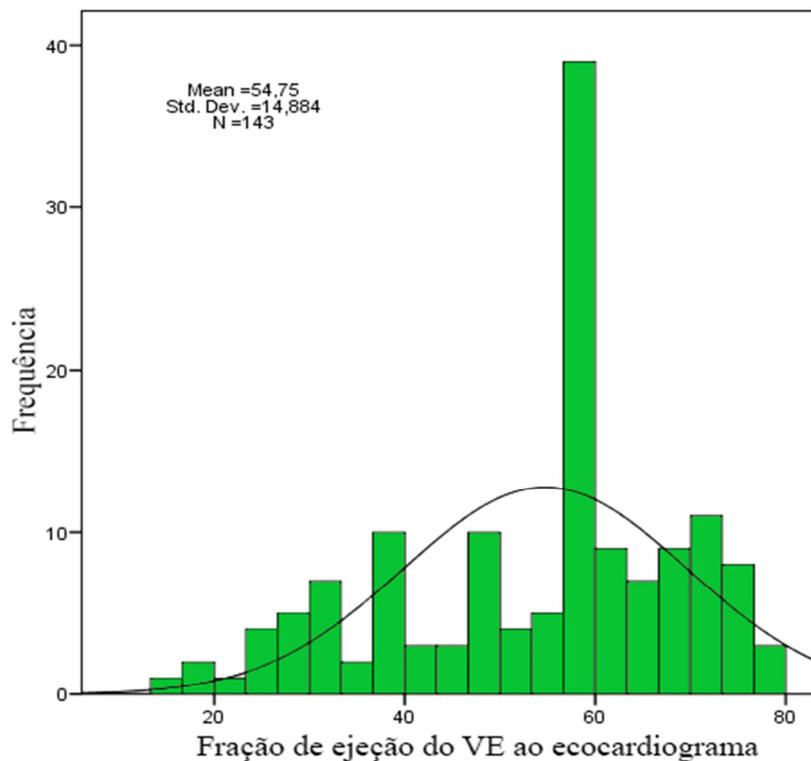
Dominância	CCC	NC
GG vs.	131	165
GC + CC	12	5

$\chi^2=4,49 - p = 0,034 - \text{O.R.}=0,33 [0,10-1,04]$

## 5.4 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA CARDIOPATIA

### 5.4.1 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA CARDIOPATIA PELA FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VE (FEVE)

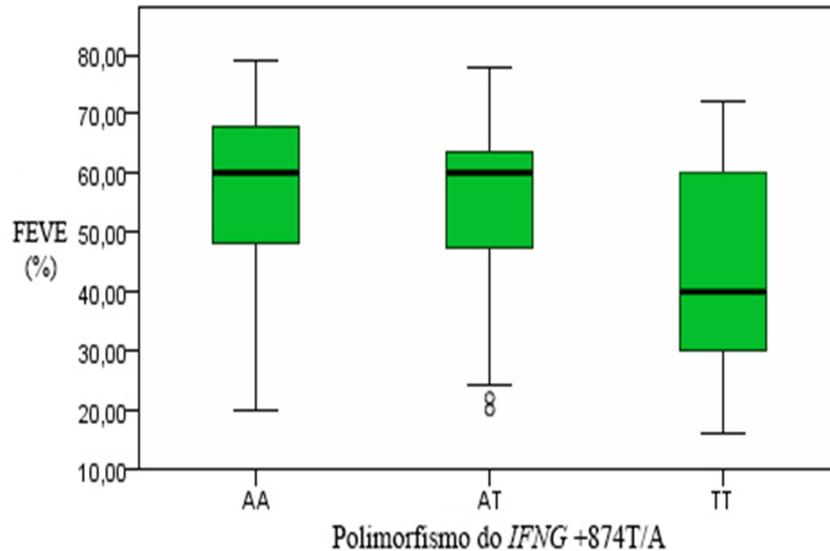
Inicialmente, para o grupo CCC, determinou-se que a fração de ejeção não tem distribuição normal. Na Figura 13 pode-se observar a distribuição das frequências de fração de ejeção com uma tendência a desvio da curva para a direita (valores próximos a 60%) diferindo da curva de normalidade.



**Figura 14:** Distribuição das frequências dos valores das frações de ejeção do ventrículo esquerdo para o grupo de pacientes com cardiopatia (CCC).

#### 5.4.1.1 PARA *IFNG* +874 T/A

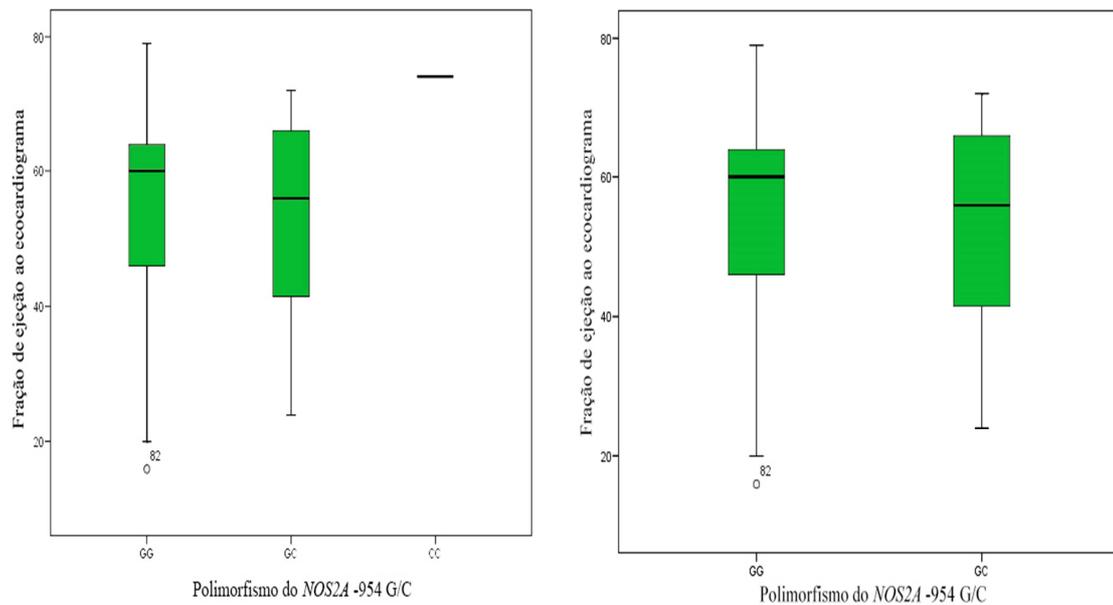
A fração de ejeção é significativamente diferente entre os subgrupos de polimorfismo do gene do interferon gama, com menores valores para o genótipo TT (Figura 14).



**Figura 15:** Representação da distribuição dos valores da fração de ejeção do grupo de cardiopatas estratificado pelo genótipo do *IFNG* +874T/A pelo teste de Kruskal-Wallis ( $\chi^2=6,60$  e  $p=0,037$ ).

#### 5.4.1.2 PARA O *NOS2A* -954 G/C

Em toda a análise exploratória do polimorfismo para o *NOS2A* -954 G/C observou-se apenas um indivíduo com genótipo CC (1 indivíduo – 0,7% dos casos – Tabela 7). Quando a comparação entre a expressão dos polimorfismos é feita, não há diferença estatística ao se estratificar pela fração de ejeção, retirando-se ou não o único indivíduo com genótipo CC da análise (Figura 16). Este único indivíduo apresentou fração de ejeção normal.



**Figura 16: Distribuição da fração de ejeção do grupo CCC estratificado pelo genótipo do *NOS2A* -954G/C. À esquerda a representação inclui o único indivíduo com genótipo CC, com resultado não significativo ( $\chi^2=2,733$  e  $p=0,255$ ) e à direita a mesma representação da análise sem o indivíduo (Mann-Whitney  $U=641$  e  $p=0,541$ ).**

#### 5.4.2 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA CARDIOPATIA PELA EXISTÊNCIA DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

##### 5.4.2.1 PARA *IFNG* +874 T/A

A estimativa do qui-quadrado para os polimorfismos do *IFNG* +874 T/A (Tabela 9) não mostra diferenças quando estratificados pela presença de insuficiência cardíaca.

Não há diferença estatística entre as combinações de genótipos em que há dominância do genótipo AA, mas há diferença estatística quando o genótipo TT está em dominância para a presença de Insuficiência Cardíaca (Tabela 9).

**Tabela 9: Frequência de genótipos para o *IFNG* +874 T/A estratificada pela presença de Insuficiência Cardíaca e análise de dominância AA vs AT+TT e TT vs AA+AT.**

		ICC	SEM ICC
GENÓTIPOS <i>IFNG</i> +874 T/A	AA <sup>1</sup>	11	56
	AT <sup>1</sup>	11	50
	TT <sup>1</sup>	6	9
$\chi^2$ for trend = 0,236 – p = 0,106			
<b>Dominância</b>	AA <sup>2</sup> vs	11	56
	AT + TT <sup>2</sup>	17	59
$\chi^2 = 0,800 – p = 0,370$			
<b>Dominância</b>	TT <sup>2</sup> vs	6	9
	AA + AT <sup>2</sup>	22	106
$\chi^2 = 4,44 – p = 0,035$			

<sup>1</sup>: Número absoluto de indivíduos com o genótipo em questão e que apresenta ou não a insuficiência cardíaca. <sup>2</sup>: Combinação dos genótipos para análise de dominância.

#### 5.4.2.2 PARA O *NOS2A* -954 G/C

Para os polimorfismos do *NOS2A* -954 G/C (Tabela 10) não há diferença entre a expressão dos genótipos quando estratificados pela presença de Insuficiência Cardíaca (p=0,75), apesar da mais frequente expressão do genótipo GG nos pacientes NC.

Em relação à dominância, não há diferenças na expressão do genótipo dominante frente aos demais (Tabela 10).

**Tabela 10: Análise de dominância dos genótipos para o *NOS2A* -954 G/C estratificada pela presença de Insuficiência Cardíaca.**

		ICC	SEM ICC
GENÓTIPOS <i>NOS2A</i> -954G/C	GG <sup>1</sup>	25	106
	GC <sup>1</sup>	3	8
	CC <sup>1</sup>	0	1
$\chi^2$ for trend = 0,094 – p = 0,750			
<b>Dominância</b>	GG <sup>2</sup> vs	25	106
	GC + CC <sup>2</sup>	3	9
$\chi^2 = 0,010 – p = 0,420$			

<sup>1</sup>: Número absoluto de indivíduos com o genótipo em questão e que apresenta ou não a insuficiência cardíaca. <sup>2</sup>: Combinação dos genótipos para análise de dominância.

### 5.4.3 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA CARDIOPATIA PELA PRESENÇA DE ECOCARDIOGRAMA ALTERADO

#### 5.4.3.1 PARA *IFNG* +874 T/A

As estatísticas para os polimorfismos do *IFNG* +874 T/A (Tabela 11) não mostram diferenças quando estratificados pela presença de ecocardiograma alterado.

Não há diferença estatística entre as combinações de genótipos em que há dominância dos genótipos dominantes (AA) ou recessivos (TT) do *IFNG* +874 T/A para a presença ou não de alterações no ecocardiograma (Tabela 11).

**Tabela 11: Análise de dominância dos genótipos para o *IFNG* +874 T/A estratificada pela presença de ecocardiograma alterado.**

		ECO ALTERADO	ECO NORMAL
GENÓTIPOS <i>IFNG</i> +874 T/A	AA <sup>1</sup>	38	29
	AT <sup>1</sup>	30	31
	TT <sup>1</sup>	11	4
$\chi^2$ for trend = 0,190 – p = 0,663			
<b>Dominância</b>	AA <sup>2</sup> vs AT + TT <sup>2</sup>	38 41	29 34
	$\chi^2=0,06 - p = 0,800$		
<b>Dominância</b>	TT <sup>2</sup> vs AA + AT <sup>2</sup>	11 68	4 60
	$\chi^2=2,22 - p = 0,136$		

<sup>1</sup>: Número absoluto de indivíduos com o genótipo em questão e que apresenta ou não alterações no ecocardiograma. <sup>2</sup>: Combinação dos genótipos para análise de dominância.

#### 5.4.3.2 PARA O *NOS2A* -954 G/C

As frequências dos polimorfismos do *NOS2A* -954 T/A não mostram diferenças quando estratificados pela presença de ecocardiograma alterado (Tabela 12).

Quando se analisa os dados para dominância do genótipo GG do *NOS2A* -954G/C nota-se ausência de significância estatística para diferença nas frequências quando estratificado pelo desfecho presença de alteração no ecocardiograma (Tabela 12).

**Tabela 12: Análise de dominância dos genótipos para o NOS2A -954 G/C estratificada pela presença de alterações no ecocardiograma.**

		ECO ALTERADO	ECO NORMAL
GENÓTIPOS NOS2A -954G/C	GG <sup>1</sup>	73	58
	GC	6	5
	CC	0	1
$\chi^2$ for trend = 0,406 – p = 0,520			
<b>Dominância</b>	GG <sup>2</sup> vs	73	58
	GC	6	5
$\chi^2 = 1,00 – p = 0,590$			

<sup>1</sup>: Número absoluto de indivíduos com o genótipo em questão e que apresenta ou não alterações no ecocardiograma. <sup>2</sup>: Combinação dos genótipos para análise de dominância. Como o único indivíduo CC foi excluído desta análise, a comparação foi feita entre GG e GC.

#### 5.4.4 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS E GRAVIDADE DA CARDIOPATIA PELA GRAVIDADE DO CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS

##### 5.4.4.1 PARA IFNG +874 T/A

As estatísticas para os polimorfismos do IFNG +874 T/A (Tabela 13) não mostram diferenças quando estratificados pela classificação do Consenso Brasileiro em doença de Chagas.

**Tabela 10: Frequências do polimorfismo do IFNG +874 T/A estratificado pela classificação do consenso brasileiro em doença de Chagas.**

		Polimorfismo do IFNG +874 T/A		
		AA	AT	TT
Classificação pelo consenso de doença de Chagas	A	29	31	4
	B1	24	17	3
	B2	3	2	2
	C	7	7	3
	D	4	4	3

$\chi^2 = 9,720$  e  $p = 0,285$

Não há diferença estatística entre as combinações de genótipos em que há dominância do genótipo dominante ou recessivo do *IFNG* +874 T/A (Tabela 14) para a gravidade expressa pela classificação do Consenso Brasileiro em doença de Chagas.

**Tabela 11: Análise de dominância dos genótipos para o *IFNG* +874 T/A estratificada pela classificação do Consenso Brasileiro em doença de Chagas.**

Dominância	Classificação pelo consenso em doença de Chagas				
	A	B1	B2	C	D
AA	29	24	3	7	4
AT + TT	35	20	4	10	7
$\chi^2 = 1,85 - p = 0,762$					
TT	4	3	2	3	3
AT + AA	60	41	5	14	8
$\chi^2 = 8,52 - p = 0,072$					

#### 5.4.4.2 PARA O *NOS2A* -954 G/C

As estatísticas para os polimorfismos do *NOS2A* -954 T/A (Tabela 15) não mostram diferenças quando estratificados pela classificação do Consenso Brasileiro em doença de Chagas.

**Tabela 12: Frequências do polimorfismo do *NOS2A* -954G/C estratificado pela classificação do consenso brasileiro em doença de Chagas.**

Classificação pelo consenso em doença de Chagas		Polimorfismo do <i>NOS2A</i> -954G/C		
		GG	GC	CC
A		58	5	1
B1		41	3	0
B2		7	0	0
C		15	2	0
D		10	1	0

$\chi^2 = 2,306$  e  $p = 0,970$ . Quando a análise é feita com a exclusão do único indivíduo do genótipo CC os valores são  $\chi^2 = 1,056$  e  $p = 0,901$ .

Não há diferença estatística para as frequências que há dominância em relação aos genótipos do *NOS2A* -954G/C para a gravidade expressa pela classificação do consenso Brasileiro em doença de Chagas (Tabela 16).

**Tabela 16: Análise de dominância dos genótipos para o *NOS2A* -954 G/C estratificada pela classificação do Consenso Brasileiro em doença de Chagas.**

Dominância	Classificação pelo consenso de doença de Chagas				
	A	B1	B2	C	D
<b>GG</b>	58	41	7	15	10
<b>GC+ CC</b> <i><math>\chi^2 = 1,45 - p = 0,836</math></i>	6	3	0	2	1
<b>CC</b>	2	0	0	0	0
<b>GG + GC</b> <i><math>\chi^2 = 2,53 - p = 0,639</math></i>	68	48	7	18	12

## 6 DISCUSSÃO

Até o presente momento (maio de 2013) há poucos relatos na literatura que descrevem as frequências e participação dos polimorfismos do *IFNG* +874 T/A na população brasileira em algumas doenças [Paracoccidioidomicose (BOZZI et al., 2009), Toxoplasmose (ALBUQUERQUE et al., 2009), Tuberculose (AMIM et al., 2008), Leishmaniose (MATOS et al., 2007)]. Apenas um trabalho (TORRES et al., 2010) analisa o polimorfismo em uma população com doença de Chagas, só que Colombiana. Para o polimorfismo do *NOS2A* - 954G/C, há maior escassez ainda, notando-se apenas um relato de literatura em carcinoma gástrico (JORGE, 2010).

Nesta amostra populacional, em que as proporções entre as formas clínicas foram semelhantes à de cerca de 2000 pacientes em acompanhamento no IPEC/FIOCRUZ, a relação paciente CCC/NC foi de 0,84 e a média de idade se situou dentro da sexta década de vida ( $55,8 \pm 10,6$  anos), com o grupo cardiopata ligeiramente mais velho do que o grupo não cardiopata ( $p=0,003$ ) o que certamente não tem importância biológica (a diferença de três anos entre as médias das idades dos grupos) pelo fato de que os pacientes já “tiveram tempo suficiente” para que os mecanismos de doença que atuam em cada um deles provocassem a progressão para a fase cardíaca. A coorte foi constituída por pacientes afastados da área endêmica por várias décadas (Tabela 1), não havendo diferença estatística entre os grupos.

A amostra populacional dividida em grupos CCC e NC não apresentou diferenças significativas quanto ao sexo, naturalidade e tempo de afastamento e obviamente mostrou diferenças significativas entre os grupos para a ocorrência de alterações do eletrocardiograma e do ecocardiograma (Tabela 1). Isto era esperado de forma a contornar possíveis vieses na constituição dos grupos que pudessem influenciar na análise das frequências dos polimorfismos, da mesma maneira que a comparação entre um grupo que não tem alterações no eletrocardiograma ou no ecocardiograma com outro que as tem foi significativa. Em relação ao estado de origem, apesar das frequências entre os grupos CCC e NC serem distintas com relação aos nascidos nos estados de Minas Gerais e Bahia, não houve diferença estatística entre elas. Exceto pelo estado de Minas Gerais, os estados do nordeste continuam a figurar como local de origem de muitos pacientes (Figura 11) e mesmo com a inclusão de Minas Gerais, estas frequências estão de acordo com trabalhos anteriores (HOLANDA, 2008). No grupo cardiopata, a presença de bloqueio de ramo direito, isolado ou em associação com hemibloqueio anterior esquerdo, foram mais frequentes, o que está de acordo com outros

estudos que analisam a frequência das alterações do eletrocardiograma nos pacientes com doença de Chagas (GOLDBAUM et al., 2004; PRATA et al., 1993). Neste mesmo grupo, a média das medidas das frações de ejeção ao ecocardiograma mostrou-se significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) do que no grupo não cardiopata, o que é obviamente esperado haja visto a existência de indivíduos com baixos valores de fração de ejeção no grupo cardiopata. Entretanto, ainda no grupo CCC, mesmo com média da fração de ejeção menor, esta situa-se em limites próximos dos normais, por conta do maior número de pacientes com valores normais (62,2%) para este parâmetro.

Quando a população é dividida pela expressão dos polimorfismos, possíveis fatores confundidores foram analisados no intuito de avaliar sua influência na presença ou não de diferenças entre os grupos (Tabela 4). Assim, apesar da idade ser pouco diferente entre os grupos CCC e NC, ao se dividir os pacientes conforme os polimorfismos, não houve diferença na expressão dos mesmos em relação à idade, sexo e naturalidade.

## 6.2 POLIMORFISMOS DO *INFG* +874T/A

A frequência observada para o genótipo TT (13,7%) está dentro dos valores observados em outros relatos já descritos para outras doenças infecciosas (como Toxoplasmose, Paracoccidiodomicose, Leishmaniose e Tuberculose) na população brasileira (entre 9% a 25%) e não houve diferença estatística quando observada a presença de cardiopatia apesar do resultado ficar próximo da significância ( $p = 0,06$  – Tabela 5). O modelo de análise de dominância do genótipo AA vs AT+TT ( $p = 0,120$ ) e do TT vs AT+AA ( $p = 0,120$ ) também não mostrou diferenças entre os genótipos.

Quando avaliado pela gravidade da cardiopatia, os indivíduos que apresentam o genótipo TT apresentam diferenças significativas para menores valores para a fração de ejeção ( $p = 0,037$  – Figura 13) e para Insuficiência cardíaca quando o genótipo TT está em dominância ( $p = 0,035$  – Tabela 9), o que não ocorre quando se estratifica os grupos pela presença de ecocardiograma alterado ( $p = 0,663$  – Tabela 11) ou pela gravidade expressa pela classificação do Consenso Brasileiro de doença de Chagas ( $p = 0,285$  – Tabela 13). Provavelmente a gravidade expressa em um grupo pela presença ou não de ecocardiograma alterado pode não ter apresentado diferença significativa pelo fato de existir um percentual relativamente maior de pacientes com ecocardiograma normal (mas com eletrocardiograma

alterado) ou com pequenas alterações (alterações segmentares pequenas) que não comprometem a fração de ejeção global, mas que classificam o paciente como cardiopata. Já a classificação pelo consenso pode ter perdido poder estatístico pelo pequeno número de pacientes em cada estágio.

Apenas um trabalho avaliou a associação dos polimorfismos do gene do IFN- $\gamma$  com cardiopatia chagásica, em uma população Colombiana (TORRES et al, 2010). Nesta publicação, assim como nesta tese, a maior parte da amostra era constituída por mulheres (69% dos pacientes assintomáticos e 59% dos pacientes cardiopatas) e a média de idade dos pacientes cardiopatas se situava na sexta década de vida (55,2 anos). Foram comparadas as frequências em pacientes soronegativos para o *T. cruzi* e soropositivos com alterações de exames complementares que os caracterizavam como cardiopatas. Entretanto, na classificação dos pacientes como cardiopatas, apenas dados de eletrocardiograma e Holter foram predominantemente usados, não tendo havido descrição de dados ecocardiográficos. Um grupo de 282 pacientes com sorologia negativa serviu como controle, enquanto que um total de 116 pacientes sem alterações cardíacas e sem sintomas foram classificados como assintomáticos e outro grupo de 120 pacientes com alterações no eletrocardiograma, Holter e RX de tórax foram considerados cardiopatas. Foi descrita diferença significativa para a expressão do genótipo AA (baixo produtor de IFN- $\gamma$ ) entre pacientes soronegativos e soropositivos, porém não houve diferença estatística para a expressão dos polimorfismos e a presença de cardiopatia. Este foi o primeiro relato que sugeriu diferenças de expressão do polimorfismo do *IFNG* +874 T/A em pacientes com doença de Chagas e foi corroborado pelos resultados encontrados neste trabalho, para os polimorfismos do gene do IFN- $\gamma$ , já que não houve associação com presença de cardiopatia em ambos. Nesta tese, entretanto, quando a cardiopatia é quantificada por diferentes formas, houve associação do genótipo alto produtor de IFN- $\gamma$  (TT) com baixos valores de FEVE e como genótipo dominante para a presença de Insuficiência Cardíaca – o que não foi avaliado no trabalho Colombiano e que faria sentido biológico.

Haveria sentido em se pensar que um paciente com elevada produção de IFN- $\gamma$  teria maior intensidade de inflamação miocárdica e maior quantidade de alterações cardíacas. Isto quase foi comprovado por este trabalho ( $p=0,06$ ), através da associação polimorfismo-cardiopatia, entretanto naqueles pacientes em que a cardiopatia se desenvolveu, o genótipo TT configura pior desempenho (mais baixas FEVE e presença de Insuficiência Cardíaca), e isto é inédito na doença de Chagas. O interferon gama é citocina com papel dúbio na patogênese da cardiopatia chagásica segundo várias publicações. Mecanismo em que a

ativação de células T CD8 citotóxicas, pela produção aumentada de interferon gama, estaria relacionada com lesão tissular tem sido proposto como fundamental para a evolução para cardiopatia (CUNHA-NETO et al., 2009; D'AVILA et al., 2009; GUTIERREZ et al., 2009). Por outro lado, outros autores com trabalhos mais antigos não encontraram relação entre cardiopatia e esta citocina (LAUCELLA et al., 2004; BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; REED, 1988).

Outros estudos mostraram associação entre os polimorfismos do gene do IFN- $\gamma$  e a gravidade ou progressão de doenças, dentre as quais se pode citar a síndrome respiratória aguda (CHONG et al., 2006), a infecção pelo vírus da Hepatite B (RIBEIRO, 2007), a Tuberculose ativa (AMIM et al., 2008) e a infecção por *Leishmania spp.* (MATOS, 2007), onde o genótipo TT favoreceria maior gravidade.

Entretanto, se consideramos que a significância foi limítrofe (na verdade um valor de 0,06) os polimorfismos do *IFNG* +874T/A podem estar relacionados com a evolução para cardiopatia, a depender de nova casuística para avaliar esta hipótese.

### 6.3 POLIMORFISMOS PARA O *NOS2A* -954 G/C

A frequência do polimorfismo CC na população geral foi de 0,7% enquanto que no único estudo brasileiro em que este polimorfismo foi analisado, até o presente momento, a frequência variou de 5,6 a 7,4%. As frequências dos polimorfismos para o *NOS2A* -954 G/C apresentaram diferenças significativas entre os grupos ( $p=0,02$ ), com genótipos de produção intermediária e aumentada de NO expressos mais frequentemente nos pacientes cardiopatas (Tabela 7). O genótipo de susceptibilidade (CC) é assim reconhecido por estar relacionado à elevada produção de NO em doenças como a Malária em algumas regiões Africanas (LEVESQUE et al., 1999; KUN et al., 2001; HOBBS et al., 2002; BURGNER et al., 2003) e a Osteomielite (ASENSI et al., 2007), em que o mecanismo principal da doença é a inflamação.

Quando divididos em grupos, o único indivíduo que apresentou o polimorfismo CC estava no estágio A do consenso de doença de Chagas, portanto que não apresentava Insuficiência Cardíaca e/ou alteração ao ecocardiograma. Quando analisado o mecanismo de dominância, nota-se que há diferença estatística na dominância do genótipo GG vs GC + CC, o que sugere que indivíduos produtores de baixa quantidade de NO (GG) teriam propensão para não desenvolver cardiopatia (Tabela 8), não tendo sido feito estimativa da

dominância do genótipo CC sobre os demais por conta da existência de um único indivíduo com este polimorfismo (acaso?).

Já na avaliação das frequências dos polimorfismos naqueles que tem cardiopatia, estratificando-se sua gravidade pela fração de ejeção ao ecocardiograma, pela presença de alterações ao ecocardiograma e pela gravidade do consenso Brasileiro de doença de Chagas observou-se ausência de diferença estatística para todos os critérios de gravidade [Insuficiência Cardíaca ( $p=0,750$  – Tabela 10), presença de alterações no ecocardiograma ( $p=0,520$  – Tabela 12), a classificação de gravidade pelo consenso Brasileiro em doença de Chagas ( $p=0,970$  – Tabela 15)]. Nestes casos os mecanismos de dominância e co-dominância entre os polimorfismos também não mostraram diferença entre si (Tabelas 10, 12 e 16). Estes resultados mostram que a expressão do polimorfismo do *NOS2A* -954 G/C não está relacionada com a gravidade da cardiopatia.

O óxido nítrico tem importantes funções biológicas e está relacionado com a imunidade inata para a defesa do organismo na infecção inicial contra vírus e protozoários como *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium sp* e *Schistosoma mansoni* (ADAMS et al., 1990; VESPA et al., 1994; WYNN et al., 1994; JAMES, 1995; STENGER et al., 1996; MURRAY & NATHAN, 1999; BRUNET, 2001). Entretanto, estaria ligado à cardiopatia por uma resposta exagerada no controle inicial do parasita e que persistiria atuando nos tecidos cardíacos por um desequilíbrio imunológico que favoreceria sua produção. Daí a hipótese de que o genótipo produtor de maior quantidade de NO estar relacionado com cardiopatia, entretanto este genótipo foi expresso apenas em um único indivíduo em toda a casuística, o que pode ter comprometido o poder de análise quando se estratifica a análise pelos critérios de gravidade. Por sua vez, o genótipo de produção intermediária de óxido nítrico – GC – também não se expressou de forma significativamente diferenciada.

No único trabalho brasileiro que explorou a expressão deste polimorfismo (JORGE, 2010) foram comparados três polimorfismos diferentes para o *NOS2A* (Ser<sup>608</sup>Leu, -954G/C e -1173C/T) em pacientes controles (164), portadores de gastrite crônica (160) e adenocarcinoma gástrico (150). A expressão dos polimorfismos do *NOS2A* -954G/C foi diferente entre os grupos na avaliação da gastrite ( $p<0,01$ ) (contra controles), mas não entre os grupos na avaliação de adenocarcinoma gástrico ( $p=0,81$ ) (contra os controles). Quando comparados os grupos gastrite e adenocarcinoma gástrico, observou-se maior expressão dos polimorfismos GC e CC no grupo adenocarcinoma, com diferença estatística entre eles, sugerindo que os pacientes que apresentam o genótipo CC têm associação com gastrite e

adenocarcinoma gástrico. O NO produzido em maiores quantidades pelos pacientes GC e CC provocaria alterações nas funções dos neutrófilos com apoptose e poderia interferir com a síntese e o reparo do DNA levando ao desenvolvimento de células tumorais.

Outra observação pode ser feita sobre a distribuição geográfica do alelo C para o genótipo na posição -954 que, uma vez expresso em certas regiões geográficas da África, pode conferir proteção contra formas graves da Malária. Estes indivíduos, quando apresentam o genótipo CC produziram maior quantidade de NO que provocaria destruição das formas hemáticas do *Plasmodium spp.*, protegendo os indivíduos contra as formas mais graves da doença. Comparativamente, em uma coorte de cem indivíduos alemães, o genótipo CC e o alelo C estavam ausentes. Amostras sanguíneas provenientes da África central e oeste mostraram maiores frequências do alelo (7-10%), enquanto no sudeste da África a frequência era menor (2-4%) (KUN, 2001).

Desta forma, neste trabalho foi possível encontrar diferenças entre grupos CCC e NC para a expressão dos genótipos do *NOS2A* -954 G/C. Esta informação é nova, não tendo sido previamente descrita na doença de Chagas, mas não foi possível demonstrar relação destes polimorfismos com gravidade de cardiopatia, o que poderia, pela primeira vez, demonstrar um mecanismo de progressão para estágios de doença cardíaca avançada.

As informações de associação entre os polimorfismos do *NOS2A* -954 G/C e cardiopatia, bem como as informações de associação de gravidade de cardiopatia e *INFG* +874 T/A podem, ao se tornarem disponíveis, ajudar no entendimento da evolução da doença e podem estimular a construção de novos trabalhos que permitam investigar outros mecanismos que possam atuar isolada ou conjuntamente para explicar a progressão da doença de Chagas.

## 7 CONCLUSÕES

Nesta população estudada os genótipos mais frequentes foram o AT do *IFNG* +874 T/A e o GG do *NOS2A* -954 G/C.

Para os genótipos do *IFNG* +874 T/A houve uma tendência na associação com presença de cardiopatia e associação do genótipo TT à maior gravidade da cardiopatia expressa por valores mais baixos da FEVE.

Houve associação entre os polimorfismos do *NOS2A* -954 G/C e o desenvolvimento de cardiopatia, mas naqueles que apresentam lesões cardíacas, não houve diferenças nos critérios de gravidade.

## 8 LIMITAÇÕES

Por ter sido utilizada uma amostra de conveniência de 313 pacientes, sem realização de cálculo amostral, é possível que em algumas análises comparativas a falta de poder estatístico tenha impossibilitado demonstrar diferenças significativas onde elas de fato existam (erro tipo 2). Apesar disso, diferenças significativas puderam ser demonstradas, e uma coerência nos resultados foi encontrada, mesmo quando as diferenças não eram “estatisticamente significativas”. Ressalte-se ainda que a casuística é na verdade considerável, que este é o primeiro estudo a analisar estas associações, e seus resultados certamente servirão para planejar estudos futuros com casuísticas ainda maiores, adequadamente calculadas.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. **Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12 regulate innate response and acquired immunity to infection.** Experimental Parasitology, v. 84, p. 231-44, 1996.
- ACQUATELLA, H. **Echocardiography in Chagas Heart Disease.** Circulation, v.115, n.9, p. 1124-31, 2007.
- ADAMS, L. B.; **Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine.** The Journal of Immunology, v. 144, p. 2725-29, 1990.
- AHN, C. S.; et al. **Cost Effectiveness of Biologic Therapies for Plaque Psoriasis.** American Journal of Clinical Dermatology, epub, maio, 2013.
- AITKEN, S. C.; et al. **A Pragmatic Approach to HIV-1 Drug Resistance Determination in Resource-Limited Settings using a Novel RT-only Genotyping Assay.** Journal of Clinical Microbiology. Março, 2013.
- ALBUQUERQUE, M. C.; et al. **The IFN-gamma +874T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. 3, p. 451-55, 2009.
- AMICO, A. F.; et al. **Superiority of visual versus computerized echocardiographic estimation of radionuclide left ventricular ejection fraction.** American Heart Journal, v. 118, n. 6, p. 1259-65, 1989.
- AMIM, L. H.; et al. **Role of IFN-gamma +874 T/A single nucleotide polymorphism in the tuberculosis outcome among Brazilians subjects.** Molecular Biology Reports, v. 35, n. 4, p. 563-66, 2008.
- ANDRADE, J. P.; et al. **I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 97, n. 2, 2011.
- ARSTALL, M. A.; et al. **Cytokine mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation.** Circulation Research, v. 85, p. 829-840, 1999.
- ASENSI, V.; et al. **The NOS3 (27-bp repeat, intron 4) polymorphism is associated susceptibility to osteomyelitis.** Nitric Oxide, v.16, p. 44-53, 2007.

- AQUILAR-LOZANO, L.; et al. **Sustained clinical remission and rate of relapse after tocilizumab withdraw in patients with Rheumatoid Arthritis.** Journal of Rheumatology, epub junho, 2013.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; et al. **IFN- $\gamma$  in human Chagas disease: protection or pathology?** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, vol. 31, p. 127-135, 1998.
- BARROS-MAZON, S.; et al. **Differential regulation of lymphoproliferative responses to Trypanosoma cruzi antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease.** Clinical Immunology, v. 111, n. 1, p. 137-45, 2004.
- BASTOS, I. M.; et al. **Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis.** Current Medical Chemistry, v. 8, 2013.
- BENDICHO, M. T.; et al. **Polymorphism of cytokine genes (TGF-beta1, IFN-gamma, IL-6, IL-10, and TNF-alpha) in patients with chronic pancreatitis.** Pancreas, v. 30, n. 4, p. 333-36, 2005.
- BLUM-DOMINGUEZ, S.; et al. **A Trypanosoma cruzi infection without serologic evidence.** Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, v. 49, n. 5, p. 537-9, 2011.
- BOZZI, A.; et al. **Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis.** Cytokine, v. 48, n. 3, p. 212-17, 2009.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Consenso Brasileiro em doença de Chagas.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38, n. III, p. 1-29, 2005.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. **Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease.** International Archives of Allergy and Applied Immunology, v. 114, p. 103-110, 1997.
- BRUNET, L. R. **Nitric oxide in parasitic infections.** International Immunopharmacology, v. 1, p. 1457-67, 2001.
- CHAGAS, C. **Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Shizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 1, n. 2, p. 159-228, 1908.
- CHAGAS, C. **Tripanosomiase americana: forma aguda da molestia.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 8, p. 37-60, 1916.

- CHANDRA, M.; et al. **Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahein strain)**. *International Journal of Parasitology*, v. 32, p. 897-905, 2002.
- CHEN, Y.; et al. **Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in the failing heart**. *Circulation*, v. 106, p. 273-79, 2002.
- CHEONG, J. Y.; et al. **Genetic polymorphism of interferon-gamma, interferon-gamma receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis B virus infection**. *Biochemical Genetics*, v. 44, n. 5-6, p. 246-55, 2006.
- CHONG, W. P.; et al. **The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome**. *BMC Infectious Diseases*, v. 6, p. 1-4, 2006.
- CICCARELLI, A.; et al. **Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi***. *Parasitology*, v. 134, n. 7, p. 959-65, 2007.
- COIA, V.; et al. **Analysis of polymorphic sites in the promoter of the nitric oxide synthase 2 gene**. *Biochemical and Biophysics Research Communications*, v. 335, p. 1123-31, 2005.
- CORDEIRO, F. D.; et al. **Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease**. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, n. 1, p. 112-8, 2001.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R.; et al. **The Role of the Immune Response on the Development of Severe Clinical Forms of Human Chagas Disease**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n. I, p. 253-255, 1999.
- COURA, J. R.; et al. **Morbidade da doença de Chagas. II. Estudos seccionais em quatro áreas de campo no Brasil**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 79, p. 101-124, 1984.
- COURA, J. R. **Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 2, p. 145-154, 2012.
- CUNHA-NETO, E.; et al. **Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy**. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 133-37, 1998.
- CUNHA-NETO, E.; et al. **Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 252-58, 2009.

- D'AVILA, D. A.; et al. **Immunological imbalance between IFN- $\gamma$  and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p.100-105, 2009.
- DE CASTRO, S. L.; et al. **Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential Trypanosoma cruzi Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones.** Molecular Biology International, v. 2011, p. 1-13, 2011.
- DE TITTO, E. H.; et al. **Cell-mediated reactivity against human and Trypanosoma cruzi antigens according to clinical status in Chagas' disease patients.** Immunology Letters, v. 9, p. 249-54, 1985.
- DERYNCK, R.; et al. **Human interferon gamma is encoded by a single class of mRNA.** Nucleic Acids Research, v. 10, n. 12, p. 3605-15, 1982.
- DIAS, J.C.P. **Control of Chagas disease in Brazil.** Parasitology today, v.3, p. 336-41, 1987.
- DIAS, J. C. P. **The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 22, n. 3, p. 147-156, 1989.
- DIAS, J. C. P. **Human Chagas Disease and Migration in the context of globalization: some particular aspects.** Journal of Tropical Medicine, v. 2013, p. 1-9, 2012.
- DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. **The Impact of Chagas disease control in Latin America – a review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 5, p. 603-12, 2002.
- DI GIROLAMO, C.; et al. **Chagas disease in a non endemic country: a study in the district of Bologna (Italy). Multidisciplinary analysis of the disease in the Latin American migrant population.** Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità, v. 22, n. 5, p. 431-45, 2010.
- DREXLER, H.; et al. **Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart.** Journal of the American College of Cardiology, v. 32, p. 955-63, 1998.
- DUTRA, W. O.; et al. **Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease.** International Immunology, v. 6, n. 4, p. 499-506, 1994.
- EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY. **ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure.** European Heart Journal, v. 29, p. 2388–442, 2008.

- FERREIRA, R. C.; et al. **Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 407-11, 2003.
- FIUZA, J. A.; et al. **Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human Chagas disease.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 3, n. 9, e512.
- GANGWAR, R.; PANDEY, S.; MITTAL, R. D. **Association of interferon-gamma +874A polymorphism with the risk of developing cervical cancer in north-Indian population.** *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 116, n. 12, p. 1671-77, 2009.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. **Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries.** *Acta Tropica*, v. 115, p. 23-27, 2010.
- GAZZINELLI, R. T.; et al. **Identification and partial characterization of Trypanosoma cruzi antigens recognized by T cells and immune sera from patients with Chagas' disease.** *Infection and Immunity*, v. 58, n. 5, p. 1437-44, 1990.
- GIORDANENGO, L.; et al. **Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring.** *European Journal of Immunology*, v. 30, n. 11, p. 3181-89, 2000.
- GOLDBAUM, M. et al.; **American Trupanosomiasis and Electrocardiographic alterations among industrial workers in São Paulo, Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 46, i. 6, p.299-302, 2004.
- GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. **Innate and Acquired Immunity in the Pathogenesis of Chagas Disease.** *Autoimmunity*, v. 37, n. 5, p. 399-409, 2004.
- GOMES, J. A.; et al. **Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response.** *Infection and Immunity*, v. 71, n. 3, p. 1185-93, 2003.
- GONZALEZ, M.; CERECETTO, H. **Novel compounds to combat trypanosomatid infections: a medicinal chemical perspective.** *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 21, n. 5, p. 699-715, 2011.
- GRAEFE, S.E.; et al. **Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to Trypanosoma cruzi in mice.** *Microbes and Infection*, v. 5, n. 10, p. 833-9, 2003.
- GRAY, P.W.; GOEDDEL, D.V. **Structure of the human immune interferon gene.** *Nature*, vol. 298, p. 859-63, 1982.

- GROVES, J. T.; WANG, C. C. Y. **Nitric oxide synthase: models and mechanisms.** Current Opinion in Chemical Biology, v. 4, n. 6, p. 687-95, 2000.
- GUEDES, P. M.; et al. **IgG isotype profile is correlated with cardiomegaly in Beagle dogs infected with distinct Trypanosoma cruzi strains.** Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 124, n. 1-2, p. 163-8, 2008.
- HAYWOOD, G. A.; et al. **Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure.** Circulation, v. 93, p. 1087-94, 1996.
- HIGUCHI, M. L.; et al. **Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process.** Virchows Archives A, Pathological anatomy and histopathology, v. 423, p. 157-160, 1993.
- HOBBS, M.R.; et al. **A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children.** Lancet, v. 360, p. 1468-75, 2002.
- HOLANDA, M. T. **Bradiarritmias com necessidade de implante de marcapasso definitivo em uma coorte de 1.251 pacientes com Doença de Chagas: Análise de incidência, preditores e mortalidade.** Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro - MEDICINA (CARDIOLOGIA), volume único, p. 86, 2008.
- HÖLSCHER, C.; et al. **Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of Trypanosoma cruzi-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase.** Infection and Immunity, v. 66, n. 3, p. 1208-15, 1998.
- JAMES, S. L. **Role of nitric oxide in parasitic infections.** Microbiological Reviews, v. 59, p. 533-47, 1995.
- JONES, E. M.; COLLEY, D. G.; TOSTES, S. J. **Trypanosoma cruzi DNA sequences in human inflammatory cardiac lesions.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 48, p. 348-55, 1993.
- JORGE, Y. C.; DUARTE, M. C.; SILVA, A. E. **Gastric cancer is associated with NOS2 - 954G/C polymorphism and environmental factors in a Brazilian population.** BMC Gastroenterology, v.10, i. 64, p. e2-e8, 2010.
- JUNIOR, A. N. R.; CARVALHO, D. M. **Os diferentes significados da certificação conferida ao Brasil como estando livre da doença de Chagas.** Cadernos de Saude Publica, v. 17, n. 6, p. 1403-12, 2001.

- JUNQUEIRA, C.; et al. **The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease.** Expert Review in Molecular Medicine. Cambridge University Press, v. 12, p. 1-20, 2010.
- KREMSNER, P. G.; et al. **High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 90, p. 44-47, 1996.
- KUN, J. F.; et al. **Nitric Oxide Synthase 2<sup>Lambare'ne'</sup> (G-954C), Increased Nitric Oxide Production, and Protection against Malaria.** The Journal of Infectious Diseases, v. 184, p. 330-36, 2001.
- LAUCELLA, S. A.; et al. **Frequency of interferon- gamma-producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease.** Clinical Infectious Diseases, vol. 189, pages. 909-918, 2004.
- LEANDRO, A. C. C. S.; et al. **Genetic polymorphisms in vitamin D receptor, vitamin D-binding protein, Toll-like receptor 2, nitric oxide synthase 2, and interferon- $\gamma$  genes and its association with susceptibility to tuberculosis.** Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas, v. 42, n. 4, p. 312-22, 2009.
- LEVESQUE, M. C.; et al. **Nitric oxide synthase type 2 promoter polymorphisms, nitric oxide production and disease severity in Tanzanian children with malaria.** The Journal of Infectious Diseases, v. 180, p. 1994-2002, 1999.
- LEVESQUE, M. C.; et al. **Malaria severity and human nitric oxide synthase type 2 (NOS2) promoter haplotypes.** Human Genetics, v. 127, n.2, p. 163-82, 2010.
- LI, Z.; et al. **Differences in iNOS and Arginase Expression and Activity in the Macrophages of Rats Are Responsible for the Resistance against *T. gondii* Infection.** PLoS ONE, v. 7, n. 4, p. 1-11, 2012.
- LINZ, W.; et al. **Interactions among ACE, kinins and NO.** Cardiovascular Reserach, v. 43, p. 549-56, 1999.
- LORENA, V. M. B.; et al. **Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinante antigens of *Trypanosoma cruzi*.** Jornal of Clinical Laboratory Analysis, v. 21, p. 1-8, 2008.
- LORENA, V. M. B.; et al. **Cytokine Levels in Serious Cardiopathy of Chagas Disease After In Vitro Stimulation with Recombinant Antigens from *Trypanosoma cruzi*.** Scandinavian Journal of Immunology, v. 72, n. 6, p. 529-39, 2010.

- MATOS, G. I.; et al. **IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production.** BMC Infectious Diseases, v. 24, p. 7-33, 2007.
- MACEDO, A.M.; et al. **Trypanosoma cruzi: Genetic Structure of Populations Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 99, n. 1, p. 1-12, 2004.
- MACHADO, F. S.; et al. **Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide dependent trypanocidal activity.** Circulation, v. 102, n. 24, p. 3003-08, 2000.
- MAGUIRE, J. H.; et al. **Electrocardiographic classification and abbreviated lead system for population-based studies of Chagas' disease.** Bulletin of the Pan American Health Organization, v. 16, n. 1, p. 47-58, 1982.
- MARIN-NETO, J. A.; et al. **Pathogenesis of chronic Chagas heart disease.** Circulation, v. 115, n. 9, p. 1109-23, 2007.
- MARIN-NETO, J. A.; et al. **The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, n. 1, p. 319-24, 2009.
- MARTINELLI, M.; et al. **Long-Term Follow-Up of Implantable Cardioverter-Defibrillator for Secondary Prevention in Chagas' Heart Disease.** American Journal of Cardiology, v. 110, n. 7, p. 1040-45, 2012.
- MARTINS-MELO, F. R.; et al. **Epidemiology of Mortality Related to Chagas' Disease in Brazil, 1999–2007.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 6, n. 2, e1508, p. 1-8, 2012.
- MARTINS-NETO, F.R.; et al. **Mortality Related to Chagas Disease and HIV/AIDS coinfection in Brazil.** Journal of Tropical Medicine, v. 2012, p. 1-4, 2012.
- MATOS, G. I.; et al. **IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production.** BMC Infectious Diseases, v.7, i.33, e1-e6, 2007.
- MAZZA, S.; FREIRE, R. S. **Manifestaciones cutâneas de inoculación, metastáticas y hematógenas en enfermedad de Chagas. Chagoma de inoculación, chagomas metastáticos y chagoma hematógenos.** Middle East Public Relations Association, n. 46, p. 3-38, 1940.
- MENEZES, C. A. S.; TEIXEIRA, M. M.; DUTRA, W. O. **A resposta imunológica dos pacientes chagásicos.** Disponível em:

<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=170>. Acesso em 10.03.2013.

- MICHAILOWSKY, V.; et al. **Humoral and cellular immune responses to Trypanosoma cruzi- derived Paraflagellar Rod Proteins in patients with Chagas' disease**. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 6, p. 3165-71, 2003.
- MONTEIRO, A. C.; et al. **Bradykinin B2 receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by Trypanosoma cruzi, are critical for the development of protective type-1 responses**. *PLoS Pathogens*, v. 3, p. e185, 2007.
- MOORE, K. W.; et al. **Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1**. *Science*, v. 248, p. 1230, 1990.
- MORAN, A.; et al. **No association between the +874T/A single nucleotide polymorphism in the IFN-gamma gene and susceptibility to TB**. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 11, n. 1, p. 113-15, 2007.
- MORATO, M. J.; et al. **Cellular immune responses of chagasic patients to antigens derived from different Trypanosoma cruzi strains and clones**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 35, n. 3, p. 505-11, 1986.
- MORGAN, J.; et al. **Anti-Trypanosoma cruzi antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 55, n. 4, p. 355-9, 1996.
- MUNGRUE, I. N.; et al. **Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death**. *Journal of Clinical Investigation*, v. 109, p. 735-43, 2002.
- MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. **Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani**. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 189, p. 741-46, 1999.
- NDAO, M.; et al. **Identification of novel diagnostic serum biomarkers for Chagas' disease in asymptomatic subjects by mass spectrometric profiling**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 1139-49, 2010.
- NICHOLSON, S.; et al. **Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with Tuberculosis**. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 183, p. 2293-302, 1996.
- OLLIER, W. E. **Cytokine genes and disease susceptibility**. *Cytokine*, v. 28, p. 174-78, 2004.

- PACHECO, A. G.; CARDOSO, C. C.; MORAES, M. O. **IFNG +874T/A, IL10-1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study.** *Human Genetics*, v. 123, p. 477-84, 2008.
- PEREIRA, F. A.; et al. **Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection.** *Journal of Medical Virology*, v. 80, n. 1, p. 58-64, 2008.
- PEREIRA BARRETO, A. C.; et al. **Arritmias e a forma indeterminada da Doença de Chagas.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 47, p. 197-99, 1986.
- PEREZ-FUENTES, R.; et al. **Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis).** *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 101, p. 123-32, 2007.
- PETHERICK, A. **After years of neglect, Brazil takes aim at Chagas disease.** *Nature Medicine*, v. 17, n. 10, pag. 1174, 2010.
- PINTO, A. Y. N.; et al. **Doença de Chagas aguda grave autóctone da amazônia brasileira.** *Revista Paraense de Medicina*, v. 21, n. 2, p. 7-12, 2007.
- POSTAN, M.; et al. **A histopathological analysis of the course of myocarditis in C3H/He mice infected with *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio-X10/4.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, p. 50-55, 1986.
- PRATA, S. P.; et al. **Prevalência de Alterações Eletrocardiográficas em 2000 pacientes Chagásicos Idosos e não idosos.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 60, n. 6, p. 369-72, 1993.
- PRAVICA, V.; et al. **A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- $\gamma$  gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- $\gamma$  production.** *Human Immunology*, v. 61, n. 9, p. 863-66, 2000.
- PRINEAS, R.; CROW, R.; BLACKBURN, H. **The Minnesota Code Manual of Electrocardiographic Findings.** John Wright-PSG, Junho, 1982.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. **An L-Arginine/nitric oxide pathway presente in human platelets regulates aggregation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, p. 5193-5197, 1990.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; RASSI, S. G. **Predictors of Mortality in Chronic Chagas Disease. A Systematic Review of Observational Studies.** *Circulation*, v. 115, p. 1101-08, 2007.

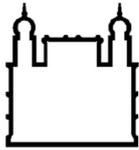
- REED, S. G. **In vivo administration of recombinant IFN $\gamma$  induces macrophage activation and prevents acute disease, immunosuppression and death in experimental *T. cruzi* infection.** The Journal of Immunology, v. 140, p. 4342-47, 1988.
- REIS, M. M.; et al. **An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R $^+$  in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens.** Clinical Immunology and Immunopathology, v. 83, p. 165-172, 1997.
- REIS, D. D.; et al. **Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- $\alpha$  $^+$  cells and dominance of granzyme A $^+$ , CD8 $^+$  lymphocytes.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 48, p. 637-44, 1993.
- REMME, J.H.F.; et al. **Tropical Diseases Targeted for Elimination: Chagas Disease, Lymphatic Filariasis, Onchocerciasis and Leprosy.** In: Disease Control Priorities in Developing Countries. Chapter 22. p. 433-49. 2006.
- REZENDE, J. M.; RASSI A. **Doença de Chagas.** In: CASTRO, L. P., CUNHA, A. S., REZENDE, J. M. Protozooses Humanas. São Paulo: Fundo editorial Byk, 1994.
- RIBEIRÃO, M.; et al. **Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase.** Parasite Immunology, v. 22, p. 49-53, 2000.
- RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M. O. C. **Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 31, n. 3, p. 301-14, 1998.
- RIBEIRO, C. S.; VISENTAINER, J. E.; MOLITERNO, R. A. **Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102, n. 4, p. 435-40, 2007.
- ROCHA, M. O.; NUNES, M. C. P.; RIBEIRO, A. L. **Morbidity and prognostic factors in chagasic cardiopathy.** Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p. 159-66, 2009.
- ROTTEMBERG, M.E.; et al. **Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction.** European Journal of Immunology, v. 26, p. 3203-3213, 1996.
- SARABANDA, A. V.; MARIN-NETO, J. A. **Predictors of mortality in patients with Chagas' cardiomyopathy and ventricular tachycardia not treated with implantable cardioverter-defibrillators.** Pacing and Clinical Electrophysiology, v. 34, n. 1, p. 54-62, Jan 2011.

- SCHMUNIS, G. A. **American Trypanosomiasis as a public health problem.** In: Pan American Health Organization (ed) *Chagas' Disease and the nervous system.* Pan American Health Organization, Washington, p. 3-29, 1994.
- SILVA, J. S.; et al. **Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection.** *The Journal of Experimental Medicine*, v. 175, n. 1, p. 169-74, 1992.
- SOARES, A. K. A. **Avaliação dos monócitos entre as formas clínicas crônicas da doença de Chagas antes e após estímulo in vitro com os antígenos recombinantes CRA e FRA de Trypanosoma cruzi.** Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, 2012.
- SOUSA, A. S.; et al. **Estratégias de Prevenção do Acidente Vascular Encefálico Cardioembólico na Doença de Chagas.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 91, n. 5, p. 306-31, 2008.
- SOUZA, P. E. A.; et al. **Monocytes from Patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity.** *American Society for Microbiology*, v. 72, p. 5283–91, 2004.
- STENGER, S.; ET AL. **Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase.** *The Journal of Experimental Medicine*, V. 183, P. 1501-14, 1996.
- TALVANI, A.; et al. **Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in chagasic cardiomyopathy.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, p. 943-950, 2004.
- TANGWATTANACHULEEPORN, M.; et al. **Association of interferon-gamma gene polymorphism (+874A) with arthritis manifestation in SLE.** *Clinical Rheumatology*, v. 26, n. 11, p. 1921-24, 2007.
- TANOWITZ, H. B.; et al. **Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease (Chagas Disease).** *Progress in Cardiovascular Disease*, v. 51, n. 6, p. 524-539. 2009.
- TEICHHOLZ L. E.; et al. **Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence or absence of asynergy.** *American Journal of Cardiology*, v. 37, p. 7-11, 1976.
- THOMPSON & THOMPSON. **Genética Médica.** Editora Guanabara Koogan, 6ª edição, p. 76-82, Rio de Janeiro, 2002.
- TORRES, O. A.; et al. **Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population.** *Infection, Genetics and Evolution*, v. 10, n. 5, p. 682-85, 2010.

- TOUBI, E.; SHOELFELD, Y.; **Toll-like Receptors and their Role in the Development of Autoimmune Diseases**. *Autoimmunity*, v. 37, n. 3, p. 183–88, 2004.
- TRUYENS, C., CARTIER, Y. Host response to parasite and its limitations. in: **American Trypanosomiasis – Chagas Disease – One Hundred Years of Research**. Estados Unidos da América, capítulo 24, p. 601-68, 2010.
- UMAR, S.; VAN DER LAARSE, A. **Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic and failing heart**. *Molecular Cellular Biochemistry*, v. 333, p. 191-201, 2010.
- URBINA, J. A. **Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. I, p. 311-18, 2009.
- WANG, Y.; MARSDEN, P. A. **Nitric oxide syntases: gene structure and regulation**. *Advances in Pharmacology*, v. 34, p. 71-90, 1995.
- WARPEHA, K.M.; et al. **Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)<sub>n</sub> repeat of NOS2A in diabetic retinopathy**. *Journal of the Federation of the American Societies for Experimentation Biology*, v. 13, p. 1825-32, 1999.
- World Health Organization. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases**. 2013. Disponível em: [www.who.int/iris/bitstream/10665/77950/1/9789241564540\\_eng.pdf](http://www.who.int/iris/bitstream/10665/77950/1/9789241564540_eng.pdf). Acesso em 30/03/2013.
- WYNN, T. A.; et al. **Elevated expression of Th1 cytokines and nitric oxide synthase in the lungs of vaccinated mice after challenge infection with Schistosoma mansoni**. *The Journal of Immunology*, V. 153, p. 5200-09, 1994.
- VALLINOTO, A. C.; et al. **IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection and clinical manifestation of tuberculosis**. *Human Immunology*, v. 71, n. 7, p. 692-96, 2010.
- VEJLSTRUP, N. G.; et al. **Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure**. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 30, p. 1215-23, 1998.
- VENTURINI, G.; et al. **Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 270, n. 2, p. 437-41, 2000.
- VESPA, G.N.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. **Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro**. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 11, p. 5177-82, 1994.

- VITELLI-AVELAR, D. M.; et al. **Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes.** Scandinavian Journal of Immunology, v. 62, n. 3, p. 297-308, 2005.
- VITELLI-AVELAR, D. M.; et al. **Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease.** Scandinavian Journal of Immunology, vol. 68, n. 5, p. 516-25, 2008.
- XAVIER, S. S.; et al. **Echocardiographic features of chronic Chagas' heart disease.** Annals of the 46th Congress of the American College of Cardiology. Anaheim; p. 145, 1997.
- XAVIER, S. S.; SOUSA, A. S.; HASSLOCHER-MORENO, A. **Aplicação da nova classificação da Insuficiência Cardíaca (ACC/AHA) na cardiopatia Chagásica crônica: Análise crítica das curvas de sobrevida.** Revista da Socerj, v.18, n. 3, p. 227-32, 2005.
- XAVIER, S. S.; et al. **Mecanismos de Morte e função ventricular na fase crônica da doença de Chagas.** Revista da Socerj, v. 19, n. 3, p. 239-46, 2006.
- XAVIER, S. S.; et al. **Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, Estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínicos, radiográficos do tórax, eletro e ecocardiográficos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, p. 211-16, 2006.
- XAVIER, S. S.; et al. **Mecanismo de morte e grau de acometimento miocárdico na fase crônica da doença de Chagas.** Revista da Socerj, v. 20, n. 2, p. 133-39, 2007.
- XU, W.; et al. **Survey of the allelic frequency of a NOS2A promoter microsatellite in human populations: assesment of the NOS2A gene and predisposition to infectious disease.** Nitric Oxide, v. 4, p. 379-83, 2000.
- ZHANG, P.; et al. **Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure.** Circulation Research, v. 100, p. 1089-98, 2007.

## APÊNDICE A – CONSENTIMENTO INFORMADO



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



### PROCESSO DE CONSENTIMENTO E DOCUMENTAÇÃO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA A PESQUISA

## IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES IMUNO-GENÉTICOS NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA DE CHAGAS

Coordenadores: Dr. Marcelo Teixeira de Holanda, Dr<sup>a</sup>. Maria da Glória Bonecini de Almeida e Dr. Sergio Salles Xavier

Colaboradores: Dr. Alejandro Marcel Hasslocher Moreno.

## PROPOSTA E SITUAÇÃO-PROBLEMA

Prezado Sr.(a)

Estamos convidando-o(a) a participar de uma pesquisa sobre a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. O objetivo é identificar se existem diferenças entre os pacientes, portadores desta doença, em relação a genética de cada um e em relação a como a doença evolui em cada um deles.

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, ou seja, a doença de Chagas é muito comum em nosso país e muitos indivíduos portadores desta doença podem desenvolver problemas cardíacos, mesmo 10 a 30 anos depois da infecção. Não há ainda vacina que previna ou um tratamento que cure a forma crônica desta doença, portanto é muito importante identificar precocemente as pessoas que tem tendência a desenvolver a doença no coração e tratá-las logo.

Caso o Sr.(a) concorde em participar desta pesquisa, será coletado uma amostra de sangue, uma única vez, para exames de hemograma, bioquímica e sorologia, bem como serão realizados exames não invasivos no coração: eletrocardiograma e ecocardiograma. Lembramos que todos estes exames já fazem parte de sua rotina clínica de acompanhamento.

A participação nesta pesquisa não irá interferir em seu acompanhamento ou tratamento realizado em nossa instituição e não haverá custo nenhum para o Sr(a).

## TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, estou sendo informado (a) sobre o projeto de pesquisa em doença de Chagas e os procedimentos necessários para participar desta pesquisa no IPEC-Fiocruz, bem como sobre os exames que farei. Fui informado também que o meu acompanhamento no Ipec não mudará, independentemente de aceitar ou não participar desta pesquisa.

### PROCEDIMENTOS

#### 1. Procedimentos

Se eu concordar em participar neste estudo, sei que:

- a) Eu concordo em realizar, a critério dos médicos, os exames de sangue e de coração.
- b) Eu permitirei que 25 mL de sangue sejam retirados para verificar a presença de fatores que determinam a progressão das lesões cardíacas (MBL, DC-SIGN, TNF, BAT1, IFN $\gamma$ , CCR5, CCR2, CCL5, M2, BETA-ADR) através de testes genéticos que serão realizados com uma amostra de DNA (material genético que fornece as características individuais de cada ser humano, animal e vegetal) extraído nesta coleta.
- c) **Fui informado que os resultados dos testes genéticos estarão disponíveis, no final da pesquisa, para meu conhecimento, mas que não terão poder de diagnóstico ou interferirão em meu tratamento.**
- d) É do meu conhecimento que todos os materiais usados para a coleta de sangue são descartáveis.
- e) Minha identificação será mantida em sigilo por todos os participantes.

## 2. Tempo

Para participar desta pesquisa terei que receber informações sobre o assunto, ler e assinar este Termo de Consentimento, além de colher a amostra de sangue.

## 3. Local do Estudo

Todo o acompanhamento clínico será realizado no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), sob a responsabilidade de meu médico, e o estudo do material obtido será feito no Laboratório de Imunologia também do IPEC, Fiocruz.

## 4. Riscos/Desconfortos

- a. A coleta de sangue normalmente não causa problemas locais. Às vezes pode ficar um pouco arroxeadado, mas isto desaparece em poucos dias.
- b. Os exames cardíacos fazem parte do acompanhamento clínico e não terão nenhuma alteração, caso eu decida ou não participar desta pesquisa.

## 5. Tratamento e compensação por danos

Não há risco de qualquer problema para a minha saúde pelo fato de coletar sangue. Todos os sintomas cardíacos e outros que por ventura aconteçam durante minha participação na pesquisa, serão tratados pelos médicos responsáveis.

## 6. Alternativas

Se eu decidir não participar desta pesquisa o tratamento médico a que eu tenho direito não será prejudicado. A necessidade de fazer os exames cardíacos e de sangue ou tratamentos para outras causas, será a mesma e o tempo de acompanhamento também será o mesmo.

## 7. Resultados dos Testes

Os resultados dos testes de sangue (hemograma, bioquímica e sorologia para a doença de Chagas) e os exames no coração serão fornecidos somente para mim pelo médico na próxima consulta. Nesta consulta, assim como na de hoje, posso fazer todas as perguntas sobre as dúvidas que tenho sobre esta pesquisa.

## 8. Custo para os entrevistados

Eu não pagarei nenhuma quantia de dinheiro para a participação neste estudo ou para os tratamentos que eu porventura necessite. Os custos de exames laboratoriais serão cobertos pelo estudo.

## 9. Confidenciabilidade dos dados

Sei que todas as minhas informações são confidenciais e constarão de meu prontuário. Somente os Drs. Alejandro Marcel Hasslocher Moreno, Sergio Salles Xavier, Marcelo Teixeira de Holanda e Maria da Glória Bonecini de Almeida e seus assistentes terão acesso a estas informações. As informações obtidas nesta pesquisa poderão ser discutidas com pesquisadores de outras Instituições, mas nenhuma identificação minha será fornecida.

Receberei uma cópia deste consentimento para mantê-la comigo.

Eu consinto em que meu endereço e telefone sejam anotados numa folha separada, para facilitar contato comigo quando necessário.

Nos próximos dias, se tiver qualquer dúvida, sobre sua participação deste estudo, favor telefonar para 3865 9531 ou 3865 9644: Dra. Maria da Glória , Dr. Marcelo Holanda e Dr. Sérgio Salles Xavier.

Local e data:

Nome do voluntário:

Endereço:

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado:

Telefone: \_\_\_\_\_

Assinatura:

Nome da testemunha:

Assinatura:

Nome de alguma pessoa que possa ser contactada, caso a Sr(a) não possa fornecer o seu endereço ou telefone no momento:

Nome:

Endereço:

## APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



IPEC

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES (IMUNO) GENÉTICOS NA EVOLUÇÃO CLÍNICA PARA A DOENÇA DE CHAGAS**

Coordenadores: Dr. Marcelo T. Holanda (IPEC), Dra. Maria da Glória Bonacini de Almeida, Dr. Sergio Salles Xavier – IPEC  
 Colaboradores: Dr. Alejandro Hasslocher-Moreno

**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

Número: ..... Prontuário: ..... Data Nascimento: ...../...../.....

ESTÁGIO:  Indeterminado  A  B1  B2  C  D

Nome: .....

1- Qual o Estado de nascimento? ..... 2- Cidade Nascimento: .....

3- Por quanto tempo viveu no Estado onde nasceu?  <5a  5-10a  10-15a  15-20a  >20a

4- Ainda reside lá?  Sim  Não

5- Alguma vez retornou ao Estado de nascimento?  Sim  Não

6- Qual o período de permanência?  <1mês  1-6meses  6m-1a  >1a

7- Já viajou para outros Estados para residir?  Sim  Não Qual? .....

8- Recebeu transfusão sanguínea?  Sim  Não

9- Possui parentes portadores da doença de Chagas?  Sim  Não

10- Algum dos parentes veio a falecer por Chagas?  Sim  Não

11- Há quanto tempo está no IPEC?  <5a  5-10a  10-15a  15-20a  >20a

Portador de: 12- HAS?  Sim  Não, 13- DM?  Sim  Não 14- Dislipidemia?  Sim  Não

15- ECG:

<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> BAV 1G	<input type="checkbox"/> BAV 2G M1	<input type="checkbox"/> BAV 2G M2	<input type="checkbox"/> BAVT
<input type="checkbox"/> HBAE	<input type="checkbox"/> BRD 1G	<input type="checkbox"/> BRD 2G	<input type="checkbox"/> BRD 3G	
<input type="checkbox"/> BRE 1G	<input type="checkbox"/> BRE 2G	<input type="checkbox"/> BRE 3G		
<input type="checkbox"/> HBAE + BRD 1G	<input type="checkbox"/> HBAE + BRD 2G	<input type="checkbox"/> HBAE + BRD 3G		
<input type="checkbox"/> BAV 1G + HBAE + BRD 2G	<input type="checkbox"/> Arritmia sinusal	<input type="checkbox"/> BAV 1G + HBAE + BRD 3G		
<input type="checkbox"/> ESV isolada	<input type="checkbox"/> ESV monomórficas	<input type="checkbox"/> ESV polimórficas		
<input type="checkbox"/> ZEI	<input type="checkbox"/> FA	<input type="checkbox"/> Flutter		
<input type="checkbox"/> ADRV	<input type="checkbox"/> Outro: .....			

16-ECO AO: ..... AE: ..... SIV: ..... PP: ..... VEd: ..... VEs: ..... FEt: ..... FEs: .....

<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> disf Leve	<input type="checkbox"/> disf Moderada	<input type="checkbox"/> disf Grave
---------------------------------	------------------------------------	--	-------------------------------------

Hipocinesia  difusa  anterior  inferior  posterior  lateral  septal

basal  médio  apical

Acinesia  anterior  inferior  posterior  lateral  anterior  septal

basal  médio  apical

Aneurisma  apical  infero-basal  outro: .....

Trombo  SIM  discinesia .....