

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Marielle Valério Corrêa

**PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO (VIP) E SEUS RECEPTORES NA FASE  
CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA**

Belo Horizonte

2013

Marielle Valério Corrêa

**PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO (VIP) E SEUS RECEPTORES NA FASE  
CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Walderez Ornelas Dutra

Co-orientadora: Dra. Cristiane Alves Silva Menezes

Belo Horizonte

2013

Colaboradores:

Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (sub-coordenador)

Departamento de Clínica Médica

Faculdade de Medicina - UFMG

Dr. Kenneth John Gollob

Santa Casa de Misericórdia – BH

SRI International – CA, EUA

Ms. Giovane Rodrigo de Sousa

Departamento de Clínica Médica

Faculdade de Medicina - UFMG



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE**

**MARIELLE VALÉRIO CORRÊA**

232/2013/05  
entrada  
1º/2011  
2011671757

Às **nove horas** do dia **01 de fevereiro de 2013**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO (VIP) E SEUS RECEPTORES NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS HUMANA**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Walderez Ornelas Dutra**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Walderez Ornelas Dutra	UFMG	APROVADA
Dra. Cristiane Alves da Silva Menezes	UFOP	APROVADA
Dra. Débora d Ávila Reis	UFMG	APROVADA
Dr. Germano Carneiro Costa	UFV	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 01 de fevereiro de 2013.**

Dra. Walderez Ornelas Dutra (Orientadora) \_\_\_\_\_

Dra. Cristiane Alves da Silva Menezes (Co-Orientador) \_\_\_\_\_

Dra. Débora d Ávila Reis \_\_\_\_\_

Dr. Germano Carneiro Costa \_\_\_\_\_

*Educar não é informar, mas formar pensadores, homens que pensam. O que você pensa determina o que você sente. O que você sente determina o que você registra em sua memória. O que você registra determina os alicerces de sua personalidade. (Augusto Cury, 2009).*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sempre iluminar meus caminhos.

Às professoras Dra. Walderez Ornelas Dutra e Dra. Cristiane Alves Silva Menezes pela oportunidade, apoio sempre concedido, sabedoria transmitida, dedicação e valiosas sugestões.

Ao Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha pelo incentivo e interesse em prol da pesquisa.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia das Interações Celulares, em especial à Natália, pela convivência, ajuda e amizade.

Aos colaboradores pela cooperação indispensável.

Aos pacientes pela participação na execução desse trabalho.

Aos meus pais, Antônio Carlos e Rosali, pelo amor e por terem sido a torcida mais fiel e presente nesse desafio.

À minha avó Evany e à Tia Zizi pelo companheirismo e por sempre me estender a mão.

Ao Gustavo pelo apoio e por acrescentar muito em minha vida.

Aos familiares que sempre me incentivaram.

Às minhas amigas de Campo Belo por compartilharmos os momentos mais importantes.

À CAPES e à FAPEMIG, pelo suporte financeiro ao longo desse período.

## RESUMO

A infecção humana pelo *Trypanossoma cruzi* leva à doença de Chagas, a qual apresenta diferentes manifestações clínicas variando da forma assintomática à cardiopatia dilatada. O sistema imune do hospedeiro é fundamental para controlar a parasitemia, entretanto, uma resposta imunológica exacerbada pode levar a danos teciduais. As interações entre os sistemas imune e nervoso desempenham um importante papel na modulação da susceptibilidade e resistência a doenças autoimunes. O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) possui uma ampla distribuição no corpo e exerce seu papel como modulador da homeostase do sistema imune. VIP é um potente agente anti-inflamatório que exerce sua atividade biológica ao se ligar aos dois receptores, VPAC1 e VPAC2. Descobertas em várias doenças humanas e em modelos experimentais relatam o efeito benéfico de VIP no controle da resposta imune. A presença de fatores genéticos relacionados ao hospedeiro, em especial, polimorfismos genéticos, podem contribuir para a evolução clínica diferencial em indivíduos infectados pelo *T. cruzi*. Essas observações permitem hipotetizar que a resposta deficiente ao VIP e a presença de polimorfismos genéticos de seus receptores podem estar relacionadas com a ampla variação no quadro clínico de pacientes chagásicos. Sendo assim, a proposta deste trabalho foi determinar os níveis plasmáticos de VIP, verificando se a expressão diferencial de VIP está associada ao desenvolvimento da cardiopatia em indivíduos infectados pelo *T. cruzi* e analisar alguns polimorfismos genéticos presentes nos genes de VPAC1 e VPAC2, correlacionando-os às diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Os níveis plasmáticos de VIP foram obtidos de 80 indivíduos através de reações de ELISA. As genotipagens dos polimorfismos rs 342511 (T/C) e rs 897 (C/T) de VPAC1, rs 2098349 (G/T) e rs 885861 (C/T) de VPAC2 foram realizadas em uma amostra de 57 pacientes cardíacos, 51 indeterminados e 40 não infectados, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Pacientes possuindo a forma cardíaca da doença apresentaram menores níveis plasmáticos de VIP. Análises de correlação mostraram que menores níveis plasmáticos de VIP foram associados com o pior funcionamento cardíaco, como determinado pela fração de ejeção ventricular esquerda e pelo valor do diâmetro ventricular diastólico esquerdo. A presença do alelo polimórfico T de rs 342511 mostrou uma associação significativa com a forma indeterminada da doença

de Chagas. Pacientes chagásicos possuem menor frequência da variante T para o polimorfismo rs 885861 de VPAC2. Os resultados indicam que a expressão de VIP e os polimorfismos rs 342511 e 885861 podem ter um importante papel na doença de Chagas, influenciando a evolução das diferentes formas clínicas.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Polimorfismo genético, VIP.

## ABSTRACT

The interconnection between immune and neuroendocrine systems influences regulation of inflammatory responses. The possible relevance that this integrative response may have during the course of Chagas disease remains poorly characterized. In this context, our study was designed to determine the expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) in blood from the indeterminate and cardiac polarized forms of Chagas disease, moreover, we determined whether the differential expression of VIP is associated with the development of cardiomyopathy in individuals infected with *Trypanosoma cruzi*. Finally, we analyzed gene polymorphisms of VIP receptors, VPAC1 and VPAC2, and performed correlation analysis of these polymorphisms with the different clinical forms of Chagas disease. VIP plasma levels were measured by ELISA and clinical parameters such as left ventricular ejection fraction and left ventricular diastolic diameter were taken by echocardiographic exams. Polymorphism analyses were performed using Real-time PCR. Our results demonstrated that low plasma levels of VIP were associated with the cardiac morbidity in Chagas disease. Accordingly, correlation analysis showed that low plasma levels of VIP were associated with worse cardiac function, as determined by left ventricular ejection fraction and left ventricular diastolic diameter values. Polymorphism analysis showed a significant association between VPAC1 and the indeterminate form of Chagas disease development. Our results indicate that VIP expression and its receptors' polymorphism may be important in determining susceptibility to progression from mild to severe forms of Chagas disease.

**Key words:** Chagas disease, polymorphism, vasoactive intestinal peptide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráficos representativos das PCRs em tempo real para a análise de polimorfismos_____	36
Figura 2 – Níveis plasmáticos de VIP_____	38
Figura 3 – Correlações entre os níveis plasmáticos de VIP e parâmetros clínicos_____	39
Figura 4 – Análise do desequilíbrio de ligação_____	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização da população de estudo para análise dos níveis plasmáticos de VIP _____	32
Tabela 2 – Caracterização demográfica da população de estudo para detecção de polimorfismos de VPAC1 e VPAC2_____	32
Tabela 3 – Caracterização dos pacientes para correlação entre os níveis plasmáticos de VIP e os parâmetros clínicos_____	32
Tabela 4 – Identificação dos polimorfismos estudados_____	35
Tabela 5 – Equilíbrio de Hardy-Weinberg_____	40
Tabela 6 – Frequências genotípicas e dos alelos para VPAC1 2234 (T/C)____	41
Tabela 7 – Frequências genotípicas e dos alelos para VPAC1 2028 (C/T)____	43
Tabela 8 – Frequências genotípicas e dos alelos para VPAC2 579 (G/T)_____	44
Tabela 9 – Frequências genotípicas e dos alelos para VPAC2 3263 (C/T)____	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

A – adenosina  
AMPc – adenosina monofosfato cíclico  
AR – artrite reumatoide  
BAL – lavado bronco alveolar  
C- – ausência do alelo C  
C – cardíaco  
C – citosina  
C/T – troca de citosina por guanina  
C+ – presença do alelo C  
MPC-1 – proteína quimiotática de monócitos-1  
CTLA-4 – linfócito T citotóxico associado à proteína 4  
IL-8 – interleucina 8  
dNTP – desoxinucleotídeos trifosfato  
FEVE – fração de ejeção ventricular esquerda  
G- – ausência do alelo G  
G – guanina  
G/A – troca de guanina por adenosina  
G/T – troca de guanina por timina  
G+ – presença do alelo G  
HPA – hipotálamo-pituitária-adrenal  
I – indeterminado  
IFN $\gamma$  – interferon gama  
IL-10 – interleucina 10  
IL-12 – interleucina 12  
IL-16 – interleucina 16  
IL1Ra – interleucina 1 Ra  
IL1 $\beta$  – interleucina 1 beta  
IL-2 – interleucina 2  
IL-6 – interleucina 6  
DDVE – diâmetro ventricular diastólico esquerdo  
NI – não infectados

NOS – sintases do óxido nítrico

OR – *Odds Ratio*

PACAP - polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária

PCR (*polymerase chain reaction*) – reação em cadeia da polimerase

PKA – proteína quinase A

RNA – ácido ribonucéico

RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro

rpm – rotações por minuto

SNC – sistema nervoso central

SNPs (*single nucleotide polymorphism*) – polomorfismo de nucleotídeo único

T- – ausência do alelo T

T – timina

*T. cruzi* – *Trypanosoma cruzi*

T/A – troca de timina por adenosina

T/C – troca de timina por citosina

T+ – presença do alelo T

TGFβ – fator de necrose tumoral beta

Th1 – subpopulação de células T CD4+ auxiliares 1

Th2 - subpopulação de células T CD4+ auxiliares 2

TNFα – fator de necrose tumoral alfa

VIP – peptídeo intestinal vasoativo

VPAC1 – receptor do tipo 1 de VIP

VPAC2 – receptor do tipo 2 de VIP

μl – microlitros

95%IC – intervalo de confiança de 95%

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
1.2 Polimorfismos genéticos relacionados à doença de Chagas.....	18
1.3 Interações entre os sistemas imune e nervoso.....	20
1.4 Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) e neuroimunomodulação.....	21
1.5 Aplicações de VIP em quadros patológicos.....	23
2 JUSTIFICATIVA.....	26
3 OBJETIVOS.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Participantes do estudo.....	31
4.2 Detecção dos níveis plasmáticos de VIP.....	33
4.3 Extração de DNA e determinação da concentração de DNA das amostras..	33
4.4 Detecção dos polimorfismos de VPAC1 e VPAC2.....	34
4.5 Análises estatísticas.....	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Análise dos níveis plasmáticos de VIP.....	38
5.2 Correlações entre os níveis plasmáticos de VIP e parâmetros clínicos.....	38
5.3 Análises de polimorfismos.....	40
5.3.1 Polimorfismo VPAC1 2234 T/C (rs342511).....	40
5.3.2 Polimorfismo VPAC1 2028 C/T (rs897).....	42
5.3.3 Polimorfismo VPAC2 579 G/T (rs2098349).....	42

5.3.4 Polimorfismo VPAC2 3263 C/T (rs885861).....	45
5.4 Análise do desequilíbrio de ligação e formação de haplótipos.....	47
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÕES.....	57
8 REFERÊNCIAS .....	59
APÊNDICE.....	67



# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da infecção parasitária conhecida como doença de Chagas e que acomete aproximadamente 11 milhões de pessoas na América Latina (WHO, 2002), sendo a doença infecciosa endêmica mais letal no hemisfério ocidental (TEIXEIRA et al., 2006). A transmissão mais freqüente dessa doença ocorre pelo contato com fezes de triatomíneos infectados, mas pode também ocorrer pela transfusão de sangue, transplante de órgãos, através da passagem do parasito pela placenta e pelo consumo de alimentos e bebidas contaminados (PRATA, 2001; HIDRON et al., 2010).

A doença de Chagas passa por duas etapas sucessivas: uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda geralmente não é percebida pelo paciente, sendo 95% dos casos assintomáticos, caracterizando-se pela presença do parasito no sangue do hospedeiro. Nos casos sintomáticos, algumas manifestações clínicas apresentadas são: febre, fraqueza, dores nas articulações, sonolência, cólicas, diarréias, edema na região de penetração do *T. cruzi* e distúrbios respiratórios (TEIXEIRA et al., 2006).

Após quatro a oito semanas, indivíduos infectados e não tratados, desenvolvem a fase crônica da doença de Chagas. Esta fase caracteriza-se pela diminuição da parasitemia e apresenta quatro formas clínicas diferentes: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva (WHO, 2002). A forma clínica indeterminada atinge cerca de 50% dos indivíduos infectados e caracteriza-se pela ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas significativas (RIBEIRO e ROCHA, 1998). Aproximadamente 50-70% dos indivíduos infectados permanecem nessa forma clínica por toda a vida (WHO, 2002). A forma cardíaca ocorre de 10 a 20 anos após a infecção primária em cerca de 10-30% dos indivíduos infectados, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade desses indivíduos (WHO, 2002). Arritmias cardíacas, aneurisma apical, tromboembolismo e insuficiência cardíaca são características desta forma clínica (TANOWITZ et al., 2009). A forma digestiva da doença de Chagas é definida pela destruição da inervação autonômica entérica ocasionando a perda da função do sistema digestivo,

sendo que esôfago e cólon são os órgãos mais frequentemente afetados (WHO, 2002). Enfim, a forma cardiodigestiva é a mais rara das formas crônicas dessa doença, acometendo órgãos dos sistemas digestório e cardiovascular. Não estão completamente esclarecidos os fatores que levam os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* a desenvolverem diferentes formas clínicas da doença (VAGO et al., 2000). Entretanto, é consenso entre os pesquisadores que a participação do sistema imune inato e adaptativo, a genética do hospedeiro, bem como a presença do parasito, são fatores determinantes para o desenvolvimento das diferentes formas clínicas (TARLETON, 2007), de modo que a forma indeterminada representa um estágio de equilíbrio imunológico entre parasito e hospedeiro enquanto as formas sintomáticas seriam resultado de atividade exacerbada do sistema imune em resposta ao parasito.

## **1.2 Polimorfismos genéticos relacionados à doença de Chagas**

Considerando a natureza multifatorial do desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas e que fatores genéticos do hospedeiro influenciam o curso da doença (DUTRA et al, 2009), a existência de polimorfismos genéticos e a comparação destes dados em pacientes das diferentes formas clínicas podem trazer informações relevantes sobre fatores relacionados ao direcionamento do desenvolvimento destas variadas formas clínicas. Polimorfismo genético é definido como à coexistência de mais de uma forma variante de um gene num dado locus, na frequência acima de 1-2%, na constituição genética de uma população (DE NARDIN, 2009).

Existem vários tipos de polimorfismos, sendo que os mais comuns são segmentos repetidos *in tandem* (nucleotídeos e microsátélites), deleções/inserções/duplicações de segmentos pequenos ou grandes (variantes do número de cópias) e polimorfismos de nucleotídeo único (CHORLEY et al., 2008). Este último, denominado SNPs, são sítios no genoma onde a sequência de DNA de uma porcentagem de indivíduos da população difere por uma única base (DE NARDIN, 2009).

SNPs podem estar presentes nas regiões codificadoras do gene e, desta forma, podem alterar a sequência de aminoácidos acometendo as propriedades

biológicas das proteínas codificadas. Quando presentes nas regiões não codificadoras dos genes, podem afetar os níveis de expressão gênica do alelo específico (WANG et al., 2005). Desta forma, a existência de SNPs pode alterar a forma como o indivíduo reage ao ambiente e influenciar a susceptibilidade a doenças (CHORLEY et al., 2008). São identificados na população humana mais de 11 milhões de SNPs segundo a base de dados de SNPs do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI).

Acredita-se que o desenvolvimento de diferentes formas clínicas na fase crônica da Doença de Chagas possa estar também relacionado à ocorrência de polimorfismos que levem a uma predisposição genética do hospedeiro aos fatores de risco dessa doença (DUTRA et al., 2009). Dentro disto, estudos recentes têm demonstrado a relação de polimorfismos, especialmente em genes codificadores de citocinas, com os diferentes quadros clínicos observados nessa patologia. Foi observado que o polimorfismo genético da IL-10 -1082 G/A na região promotora está associado ao desenvolvimento da cardiomiopatia em indivíduos infectados pelo *T.cruzi*, uma vez que uma maior expressão de IL-10 está relacionada a um melhor funcionamento cardíaco (COSTA et al, 2009). Em um estudo de sobrevivência da população brasileira, Drigo e colaboradores (2006) observaram que o alelo polimórfico A no gene de TNF $\alpha$  localizado na posição -308 G/A é mais frequente em pacientes chagásicos quando comparados com indivíduos saudáveis e esta variante está associada ao alto risco da progressão para a morte. Em relação à citocina TGF $\beta$ , foi demonstrada uma grande frequência do SNP +10 T/C no gene TGF $\beta$ 1 entre pacientes chagásicos colombianos e peruanos, sendo a variante C relacionada à susceptibilidade à doença e o genótipo CC, que é o alto produtor, foi também mais frequente nos pacientes em ambas as populações (CALZADA et al., 2009). O polimorfismo rs2430561 no gene do IFN $\gamma$  +874 T/A também deve estar envolvido com a predisposição à doença de Chagas na população Colombiana, sendo que a frequência do genótipo AA, relacionado com uma menor produção de IFN $\gamma$ , foi maior nos pacientes comparada ao controle (TORRES et al., 2010). Nessa mesma população, a presença do alelo G no polimorfismo +5810 G/A no gene codificador de IL1 $\beta$  foi associado com o risco aumentado para a doença de Chagas cardíaca e a presença do genótipo GG foi relacionada com predisposição à cardiomiopatia (FLÓREZ et al., 2006). Os alelos -1031C e -308A dos polimorfismos

de TNF $\alpha$  na população Colombiana também foram associados com o alto risco de desenvolver a cardiopatia chagásica. Esses dados revelam que polimorfismos em genes de citocinas podem contribuir para o curso da doença de Chagas desde que sua presença pode significar alterações de expressão e, conseqüentemente, influenciar a resposta imune do hospedeiro (CRIADO, et al., 2012).

### **1.3 Interação entre os sistemas imune e nervoso**

As interações entre os sistemas imune e nervoso desempenham importante papel na modulação da susceptibilidade e resistência a doenças inflamatórias e infecciosas (STERNBERG, 1997). Muitos dos efeitos regulatórios do sistema neuroendócrino sobre a resposta do sistema imune se dão através das ações de hormônios glicocorticóides, entretanto, a regulação neuroendócrina ocorre em múltiplos níveis: sistemicamente, através da ação de glicocorticóides liberados pela estimulação do eixo HPA (hipotálamo–pituitária–adrenal); regionalmente, através da produção local de glicocorticóides em órgãos como o timo e, localmente, em sítios inflamatórios, através da liberação de neuropeptídeos e neurohormônios por nervos periféricos (STERNBERG, 2006). Em contrapartida, durante um quadro inflamatório, o sistema imune se comunica com o sistema nervoso central (SNC), através da produção de citocinas que podem cruzar ativamente a barreira hematoencefálica. De outro modo, citocinas podem ativar sistemas de segundos mensageiros de células endoteliais, incluindo óxido nítrico sintase e ciclooxigenase, culminando na ativação indireta das funções do SNC. Adicionalmente, citocinas como IL-1 sinalizam o SNC através da estimulação do nervo vago (BLUTHE et al., 1994, WATKINS et al., 1994). A sinalização do sistema imune para o SNC causa a ativação do eixo HPA, que, por sua vez, libera corticotropina (hipotálamo) e adrenocorticotropina da pituitária. Estes hormônios estimulam as adrenais que liberam glicocorticóides que inibem a inflamação (STERNBERG, 2006). Resumidamente, o sistema imune influencia diretamente as atividades do sistema nervoso pela liberação de citocinas, assim como sofre influências do sistema nervoso que estimula ou inibe suas atividades (BRODGEN et al., 2005). Ambos os sistemas interagem através da produção de mediadores neuroimunes como citocinas, hormônios, neuropeptídeos e quimiocinas,

havendo assim o compartilhamento desses ligantes e seus respectivos receptores por esses sistemas (DELGADO et al., 2004).

Entre os mediadores neuroendócrinos, neuropeptídeos que são liberados pelo sistema nervoso e surpreendentemente por algumas células sanguíneas tem efeitos profundos na resposta imune, funcionando como mediadores das interações neuroimunes (GONZALEZ-REY e DELGADO, 2007). Os neuropeptídeos são substâncias químicas que contém de 3 a 100 aminoácidos, são maiores que neurotransmissores clássicos e menores do que proteínas regulares, possuindo estrutura tridimensional menos complexa e estão presentes no cérebro em concentrações mais baixas do que outros neurotransmissores, diferenciando dos últimos em sua síntese, armazenamento e sinalização; a saber: enquanto neurotransmissores são armazenados em vesículas sinápticas, são liberados sob estimulação de baixa frequência e agem em receptores ionotrópicos e receptores acoplados à proteína G; os neuropeptídeos são produzidos pelos ribossomos e empacotados em corpos vesiculares densos, sua liberação requer estimulação de alta frequência e agem apenas em receptores acoplados à proteína G. (HOKFELT et al., 2003). Alguns exemplos de neuropeptídeos que possuem atividades imunomodulatórias são: peptídeo intestinal vasoativo (VIP), hormônio estimulante de  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH), urocortina, adrenomodulina, cortistatina e grelina (DELGADO e GANEA, 2008).

O neuropeptídeo alvo do nosso trabalho, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), exerce papel imunorregulador e neuromodulador agindo em vários órgãos e tecidos, além de participar de diferentes atividades biológicas (HENNING e SAWMILLER, 2001).

#### **1.4 Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) e neuroimunomodulação**

Cronologicamente, em 1968, Said e Mutt isolaram um peptídeo hipotensivo vasodilatador em extratos duodenais e o nomearam de peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (DELGADO et al., 2004). Em 1976 foi descoberta a localização deste peptídeo no sistema nervoso central e periférico (SAID e ROSENBERG, 1976). Um pouco mais tarde, foi identificado que VIP também é produzido por células do sistema

imune durante condições inflamatórias ou sob estimulações antigênicas (GONZALEZ-REY e DELGADO, 2007).

VIP é um neuropeptídeo que contém 28 aminoácidos e é estruturalmente relacionado com outros hormônios como secretina, glucagon, peptídeo inibitório gástrico, entre outros, sendo mais próximo do polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP) (Said, 1986).

Este neuropeptídeo é sintetizado de uma molécula precursora (prepro VIP) que contém PHM (peptídeo com histidina N-terminal e o amido metionina C-terminal) em humanos ou PHI (peptídeo com histidina N-terminal isoleucina C-terminal) em outras espécies. O prepro VIP é metabolizado no retículo endoplasmático produzindo o pro-VIP, sendo clivado até ser transformado em VIP ativo (ITOH, 1983).

VIP desempenha sua atividade biológica ao se ligar principalmente a VPAC1 e VPAC2 que são receptores acoplados a proteína G, expressos em diferentes células imunocompetentes. Após a ligação com esses receptores, a sinalização é feita por ativação da via AMP cíclico/proteína quinase A (PKA) (GONZALEZ-REY e DELGADO, 2007). Esses dois receptores possuem uma mesma arquitetura molecular com sete domínios transmembrana, três loops extracelulares (EC1, EC2 e EC3), três loops intracelulares (IC1, IC2 e IC3), um longo domínio extracelular amino-terminal e um domínio intracelular carboxil-terminal (DELGADO et al., 2004). VIP também pode se ligar, com baixa afinidade, ao receptor PAC1 que possui estrutura semelhante aos receptores VPAC1 e VPAC2 e alta afinidade para PACAP (LAUNGER; ROBBERENCHT, 2007), um neuropeptídeo.

O receptor humano VPAC1 é codificado pelo gene VPAC1 localizado no cromossomo 3p22 (SREEDHARAN et al., 1995), sendo expresso no cérebro (córtex cerebral e hipocampo) e em tecidos periféricos como fígado, pulmão e intestino. Além de ser também constitutivamente expresso em linfócitos (incluindo timócitos, células T CD4 e CD8), macrófagos, monócitos, células dendríticas e mastócitos (DELGADO et al., 2004).

O gene do receptor humano VPAC2 está localizado na região 36.3 do cromossomo 7 (MACKAY et al., 1996). A expressão deste receptor se dá no sistema nervoso central (principalmente no tálamo e núcleo supraquiasmático, e em menores quantidades no hipocampo, tronco cerebral, cordão espinhal e em gânglios da raiz dorsal) e em tecidos periféricos, incluindo pâncreas, músculo esquelético, pulmão,

coração, rins, tecido adiposo, testículo, estômago e vasos sanguíneos. No sistema imune, este receptor é expresso em baixos níveis nas células não ativadas, podendo ser induzida sob estímulo (DELGADO et al., 2004). VPAC2 compartilha 45% da sequência de aminoácidos idênticas ao VPAC1 (LABURTHE et al., 2002).

Quando liberado nos órgãos linfóides por estímulo nervoso e pelas células imunes ativadas, VIP modula a função de células inflamatórias através desses receptores, afetando, assim, a imunidade inata e adaptativa (POZO e DELGADO, 2004; GONZALEZ-REY et al., 2006).

Entre as principais ações fisiológicas de VIP, destacam-se: vasodilatação sistêmica, broncodilatação, hiperglicemia, relaxamento suave dos músculos, regulação hormonal, analgesia, efeitos neurotróficos, efeitos no processo secretório no trato gastrointestinal, aprendizagem e comportamento (DELGADO et al., 2004). Além disso, VIP é um dos fatores endógenos que participa na manutenção da tolerância imune e exibe potente atividade anti-inflamatória, sendo um candidato potencial para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias (POZO et al., 2007). Dentro disto, a relevância desse neuropeptídeo está na inibição da atividade fagocítica, da produção de radicais livres, da aderência e migração de macrófagos (DE LA FUENTE et al., 1996); na diminuição da produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral, IL-12, IL-16 e IL-1 $\beta$  (DELGADO et al., 1996); na redução da expressão de sintases do óxido nítrico e ciclooxigenase; na estimulação à produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-1Ra (DELGADO et al., 1999); na diminuição da expressão dos receptores Toll (TLRs) (GOMARIZ et al., 2005), na geração de células T reguladoras através da conversão de células TCD4+CD25- a células TCD4+CD25+ pelo aumento da expressão de CTLA-4, molécula importante na função e geração de linfócitos T reguladores (ANDERSON E GONZALEZ-REY, 2010).

### **1.5 Aplicações de VIP em quadros patológicos**

Resultados recentes, em modelos experimentais, têm demonstrado efeito positivo do tratamento de VIP em diferentes quadros patológicos, em que o neuropeptídeo têm se apresentado como um potente agente anti-inflamatório. Camundongos com deleções no gene de VIP exibem, espontaneamente,

hiperatividade brônquica ao desafio com metacolina, bem como, infiltrado inflamatório peribronquiolar e perivascular além de aumentados níveis de citocinas pró-inflamatórias no lavado broncoalveolar. A administração intraperitoneal de VIP durante duas semanas, virtualmente, eliminou a hiperatividade brônquica e reduziu a inflamação nestes camundongos. Estes achados sugerem que VIP pode ser um importante mecanismo antiasmático endógeno, que a deficiência deste neuropeptídeo pode levar à predisposição ao desenvolvimento da asma e que o tratamento com VIP pode ser útil como terapia para esta doença (SZEMA ET AL., 2006). Delgado e colaboradores (2004) relataram que o tratamento de camundongos artríticos com VIP resultou no retardo da doença e no abrandamento de sua severidade através da redução da resposta inflamatória e autoimune, e estes benefícios foram dados pelo aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-1Ra. O estudo experimental da doença de Crohn revelou que o tratamento com VIP reduziu a severidade clínica e histopatológica da colite, paralisou a perda de peso, a diarreia e a inflamação intestinal. Interessantemente, seus efeitos são observados em qualquer estágio da doença, inicial, agudo ou crônico (ABAD et al., 2003). Na esquistosomose murina, VIP suprimiu a proliferação de células T do granuloma bem como a produção de IL-2 (WEINSTOCK, 1996). Além de seu comprovado papel imunomodulador, VIP apresentou forte atividade antimicrobiana frente ao *Trypanosoma brucei*, provocando morte dos parasitos pela destruição da integridade de sua membrana, e, no caso de animais infectados por este parasito, foi observada uma melhora dos sintomas na forma crônica da tripanosomíase através da redução da carga parasitária em muitos órgãos alvos (DELGADO et al., 2009).

Estudos em humanos também confirmaram o importante papel imunomodulador de VIP em diversos quadros patológicos. Procurando observar se a resposta inflamatória autoimune observada na artrite reumatóide (AR) tem relação com alterações na expressão e/ou sinalização de receptores de VIP, Delgado e colaboradores (2008) mostraram que monócitos e células sinoviais de pacientes com artrite reumatóide apresentaram expressão deficiente de VPAC1 e menor responsividade à sinalização de VIP do que as células de indivíduos saudáveis. Além disso, a associação entre polimorfismos genéticos de VPAC1 e a expressão deficiente deste receptor foi observada em pacientes com AR (DELGADO et al.,

2008). A expressão do receptor VPAC2 foi menor nas células T CD4<sup>+</sup> ativadas de pacientes com esclerose múltipla comparadas aos indivíduos controle, que apresentaram maior expressão deste receptor. Mas essa alteração não foi associada com polimorfismos genéticos, e sim, com a regulação anômala de ligação de fatores de transcrição na região promotora do gene de VPAC2 (SUN et al., 2006). Prasse e colaboradores, em 2010, utilizaram VIP para testar a hipótese de que este neuropeptídeo, inalado por pacientes com sarcoidose, poderia apresentar um efeito imunorregulador benéfico. O tratamento com VIP foi seguro, bem tolerado e levou a uma redução da produção de TNF-alfa por células isoladas do lavado bronco alveolar (BAL) destes pacientes. Além disso, foi observado aumento do número de células T reguladoras no BAL dos indivíduos tratados. Este estudo suporta a idéia de que a inalação de VIP possa ser uma interessante terapia para tratamento de distúrbios pulmonares que envolvam resposta imune exacerbada. Vale a pena ressaltar que pacientes sofrendo de esclerose múltipla e lúpus eritematoso sistêmico apresentaram menor quantidade de VIP circulante ou de seus receptores do que indivíduos saudáveis (Anderson e Delgado, 2008), sugerindo uma correlação entre susceptibilidade a doenças autoimunes e via de sinalização de VIP deficiente.

Atualmente, não estão disponíveis na literatura dados correlacionando a expressão de VIP com o funcionamento cardíaco no quadro da doença de Chagas. Polimorfismos genéticos podem estar envolvidos com a susceptibilidade a essa doença. Nossa hipótese é que a expressão diminuída de VIP, assim como a ocorrência de polimorfismos genéticos podem estar envolvidos com o desenvolvimento da cardiomiopatia em pacientes chagásicos crônicos.



## JUSTIFICATIVA

A Doença de Chagas é um problema de saúde pública que abrange os países da América Latina com um grande número de indivíduos acometidos e/ou expostos a riscos de infecção. A ativação do sistema imunológico do hospedeiro pela presença do parasito leva à eliminação do patógeno, entretanto, a ativação descontrolada de células do sistema imune pode levar o indivíduo a sérias consequências como a destruição de tecidos, comprometimento da função de alguns órgãos e até a morte. Os mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase do organismo compreendem a apoptose de células imunes ativadas, liberação de agentes anti-inflamatórios como citocinas e glicocorticóides. Recentemente, VIP foi adicionado a uma lista de agentes anti-inflamatórios endógenos. Deste modo, estudos sugerem o uso de VIP no desenvolvimento de terapias para inúmeras desordens (GOZES e FURMAN, 2003), além disso, seu papel como uma citocina do tipo Th2 torna o estudo das atividades deste neuropeptídeo em quadros inflamatórios e/ou autoimunes bastante atraentes.

Sabendo-se que as células do sistema imune exercem papel central na patologia chagásica, que estas células são expostas a uma variedade de neuropeptídeos secretados e expressam receptores específicos para estes neurotransmissores, é possível argumentar que estes peptídeos possam influenciar o curso da doença de Chagas através da modulação da resposta imune.

Além disso, polimorfismos genéticos são investigados na doença de Chagas e em diversas patologias inflamatórias a fim de estabelecer a existência de relação entre fatores genéticos e a predisposição às doenças. Desta forma, compreender o papel de VIP no quadro da patologia chagásica, bem como a existência de fatores genéticos do hospedeiro, é relevante no sentido de poder esclarecer um pouco mais o desenvolvimento de diferentes formas clínicas existentes na doença de Chagas.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral:

O objetivo geral deste projeto consiste em avaliar a expressão do peptídeo intestinal vasoativo em pacientes das formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas, correlacionando-a a parâmetros clínicos relacionados à função cardíaca além da avaliação da ocorrência de polimorfismos genéticos dos receptores de VIP em pacientes chagásicos.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar os níveis plasmáticos de VIP em indivíduos saudáveis e pacientes chagásicos, portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca;

- Verificar se a expressão diferencial de VIP correlaciona-se a valores de FEVE (fração de ejeção ventricular esquerda) e DDVE (diâmetro ventricular diastólico esquerdo) em indivíduos infectados pelo *T. cruzi*;

- Avaliar a ocorrência de variantes genéticas dos receptores constitutivo e indutível de VIP, VPAC1 e VPAC2 respectivamente, em pacientes chagásicos portadores das formas indeterminada e cardíaca e indivíduos não chagásicos;

- Avaliar a ocorrência destes polimorfismos ao desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica, buscando perfil genético de susceptibilidade ao desenvolvimento da forma grave da doença.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Participantes do estudo

Os pacientes que fizeram parte deste estudo foram selecionados no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes-Diniz (CTR-DIP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. O diagnóstico da doença de Chagas foi confirmado através de sorologia para *T. cruzi*. O tratamento e cuidados clínicos destes pacientes estavam sob a responsabilidade do Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha. Os indivíduos que foram analisados neste trabalho formaram três grupos distintos: pacientes chagásicos indeterminados, pacientes chagásicos cardíacos e indivíduos não infectados, que constituíram o grupo controle. A classificação dos pacientes chagásicos em indeterminados e cardíacos seguiu critério estabelecido por Ribeiro e Rocha (1998).

O grupo indeterminado compreendeu pacientes que não apresentaram sintomas da doença, os exames radiográficos e eletrocardiográficos normais, sendo a doença evidenciada somente pela positividade de testes sorológicos específicos. Neste mesmo grupo enquadraram-se pacientes assintomáticos, com pequenas alterações detectáveis em exames de alta sensibilidade como testes ergométricos e holter.

O grupo de pacientes com cardiopatia compreendeu indivíduos que apresentaram variadas alterações cardíacas observadas através de eletrocardiograma, bloqueio do ramo direito, extra-sístolia freqüente e hemibloqueio anterior esquerdo, além de cardiomegalia.

O grupo não infectado foi caracterizado por indivíduos não infectados pelo *T. cruzi*, determinado por sorologia específica.

Foram utilizados alguns critérios de exclusão: presença de diabetes mellitus, disfunções na tireoide, insuficiências renais, hipertensão arterial sistêmica, doença digestiva, doença pulmonar obstrutiva crônica, doenças reumáticas e/ou autoimunes.

Para análise dos níveis plasmáticos de VIP foram utilizados plasmas de 80 indivíduos, conforme a caracterização na tabela 1. Para a detecção de polimorfismos

de VPAC1 e VPAC2 foram coletadas amostras celulares de 148 indivíduos, conforme descrição na Tabela 2.

**Tabela 1 – Caracterização da população de estudo para análise dos níveis plasmáticos de VIP.**

Forma Clínica	Indeterminado n= 26	Cardíaco n= 26	Não infectado n= 28	Total n=80
Masculino	10 (38,5%)	19 (73%)	10 (35,7%)	39 (48,8%)
Feminino	16 (61,5%)	7 (27%)	18 (64,3%)	41 (51,2%)

**Tabela 2 – Caracterização demográfica da população de estudo para detecção de polimorfismos de VPAC1 e VPAC2.**

Forma Clínica	Indeterminado n= 51	Cardíaco n=57	Não infectado n=40	Total n=148
Masculino	27 (53%)	35 (61,4%)	10 (25%)	72 ( 48,6%)
Feminino	24 (47%)	22 (38,6%)	30 (75%)	76 (51,4%)
Faixa etária	25-70	24-78	20-34	
Média ± DP	48±11,9	53±10,7	26±4,6	

**Tabela 3 – Caracterização dos pacientes para a correlação entre os níveis plasmáticos de VIP e os parâmetros clínicos.**

Identificação do Paciente	Sorologia para a Doença de Chagas	Forma clínica	Idade (anos)	Sexo	FEVE (%)	DDVE (mm)
D7	Positivo	Cardíaca	50	Masculino	51	64
D8	Positivo	Cardíaca	63	Masculino	37	65
D6	Positivo	Cardíaca	57	Feminino	27	70
D4	Positivo	Cardíaca	75	Masculino	46	65
D1	Positivo	Cardíaca	59	Feminino	34	70
I6	Positivo	Indeterminada	50	Feminino	68	50
I7	Positivo	Indeterminada	34	Masculino	67	46
I2	Positivo	Indeterminada	56	Feminino	74	58
I3	Positivo	Indeterminada	54	Feminino	63	50

As correlações entre os níveis plasmáticos de VIP e os valores de fração de ejeção e diâmetro ventricular diastólico esquerdo, FEVE e DDVE, respectivamente, foram analisadas em amostras de nove pacientes, sendo quatro pertencentes à forma clínica indeterminada e cinco possuindo a forma clínica cardíaca, conforme descrição na Tabela 3.

Os pacientes que participaram deste estudo assinaram um termo de consentimento para a participação. Este trabalho faz parte de um estudo maior aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o parecer # 195/2007.

#### **4.2 Detecção dos níveis plasmáticos de VIP**

Alíquotas de plasmas do banco de amostras do Laboratório de Biologia das Interações Celulares foram utilizados. Estes plasmas foram adquiridos previamente através da coleta de sangue em tubos contendo o anticoagulante EDTA, seguida de centrifugação utilizando gradiente de Ficoll.

As dosagens de VIP nas amostras de plasmas foram feitas pelo Instituto Genese de Análises Científicas (IgAC) através de um imunoenensaio competitivo (Kit da Peninsula Laboratories). Em cada poço foram adicionados 50µl de padrão ou amostra, 25µl do anticorpo anti-VIP e 25µl de VIP biotinilado. A placa foi incubada por 2 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. Após incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 200µl de tampão de lavagem. Foram adicionados 100µl de streptavidina-HRP a cada poço seguida de nova incubação por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. A placa foi lavada novamente com a posterior adição de 100µl de solução contendo o substrato e seguiu-se a incubação por 1 hora. A reação foi terminada pela adição de 100µl de solução de HCl (2N). As placas foram lidas no comprimento de onda de 450nm em espectrofotômetro. Uma curva padrão foi gerada e usada para determinar a quantidade de VIP nas amostras.

#### **4.3 Extração de DNA e determinação da concentração de DNA das amostras**

Células de raspado bilateral da mucosa oral foram coletadas em tubos *ependorffs* contendo solução de Krebs (KCl 4mM, NaCl 124mM, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 10mM,

C8H17N2NaO4S 23mM, MgSO4 1mM) e armazenadas a -20°C para posterior extração do DNA. O método descrito por Boom e colaboradores (1990) – modificado, foi utilizado para extrair o DNA das amostras coletadas. Esse método baseia-se na adesão do DNA à sílica, permitindo sua purificação por precipitação, conforme descrito a seguir.

Os *ependorffs* contendo o raspado da mucosa oral e solução de Krebs foram submetidos à centrifugação a 11.000 rpm por 5 minutos. Foi obtido um *pellet* e o sobrenadante foi retirado com o uso de uma pipeta e descartado. 450µL de solução de lise (GuSCN 4M, Tris-HCl 50mM, EDTA 22mM, Triton X-100 1,2%) e 20µL de solução de sílica (SiO2 lavado com H2O) foram adicionados ao *pellet*. Vórtex foi utilizado para ressuspender o *pellet* e depois foi feita a incubação a 56°C durante 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado com 450µL de solução de lavagem (GuHCl 6M, Tris-HCl 60mM) e as amostras foram centrifugadas novamente a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Uma nova lavagem com L2 (GuHCl 6M, Tris-HCl 60mM) foi feita. Ao *pellet* foi adicionado 450µL de etanol 70%. O *pellet* foi ressuscitado utilizando o vórtex e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Novamente, foi realizada outra lavagem com etanol a 70%. Após esse procedimento, foi adicionado ao *pellet*, 450µL de acetona 100%. As amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e, os *ependorffs* contendo os *pellets* das amostras foram colocados em termobloco (BioPlus) à 56°C por 30 minutos, com tampas abertas para a total eliminação da acetona. Os *pellets* foram ressuscitados com 100µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM – pH=8) com auxílio de vórtex e incubados em termobloco à 56°C *overnight* (ON). Após a incubação, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

A concentração de DNA de cada uma dessas amostras foi quantificada em *NanoDrop 1000* (*Thermo Scientific*) utilizando-se 1µL da amostra de DNA. Conforme a concentração obtida, uma alíquota contendo 50 ng de DNA era usada para a reação de PCR.

#### **4.4 Detecção dos polimorfismos de VPAC1 e VPAC2**

A genotipagem foi realizada através da amplificação pelo método Real Time PCR. Para tanto, a amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada utilizando-se o sistema TaqMan. Esse sistema utiliza além dos primers, uma sonda (oligonucleotídeo) contendo um corante fluorescente ligado a sua extremidade 5' e um quencher ligado a extremidade 3'. Essa sonda liga-se a uma região do DNA posterior ao primer. Quando a polimerase começa a sintetizar o fragmento de DNA a partir do primer, ela é capaz de clivar a sonda e separar o corante do quencher havendo, dessa forma, liberação de um sinal fluorescente. Cada genótipo possui uma sonda fluorescente diferente e dessa forma, é possível determinar o genótipo do polimorfismo a ser estudado de acordo com o sinal produzido. Os iniciadores foram escolhidos pela lista disponível comercialmente pela Applied Biosciences, consistindo de iniciadores e sondas validados para os ensaios genotípicos, assegurando a qualidade dos dados. As PCRs foram feitas com a utilização de *TaqMan® SNP Genotyping Master Mix* (mix contendo dNTPs, *Taq* polimerase e tampão de incubação), *TaqMan® SNP Genotyping assay* (contendo o par de *primers* e sondas) e DNA genômico.

As identificações dos polimorfismos estudados estão expressas na tabela 4.

**Tabela 4 – Identificação dos polimorfismos estudados**

Polimorfismo	Posição	Troca de Bases	Cromossomo	Identificação
VPAC1 2234	3'UTR	T/C	Cr-3	rs 342511
VPAC1 2028	3'UTR	C/T	Cr-3	rs 897
VPAC2 579	3'UTR	G/T	Cr-7	rs 2098349
VPAC2 3263	3'UTR	C/T	Cr-7	rs 885861

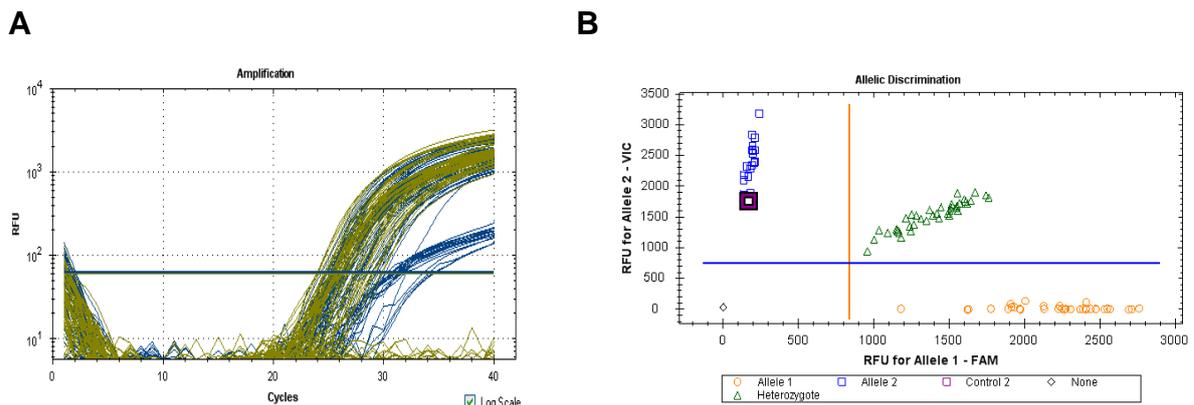
Para a reação de PCR utilizou-se o termociclador *CFX96™ Real Time PCR Detection System (BioRad)*. Utilizou-se uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Essas reações foram feitas em placas de 96 poços, sendo inseridos um controle negativo e um positivo.

O genótipo para cada polimorfismo presente neste estudo foi determinado utilizando-se o software *CFX-Manager* da *Bio-Rad*. Tendo em vista que cada alelo está associado a um fluoróforo diferente, a demonstração de só um sinal

fluorescente refere-se ao genótipo homocigoto, já a demonstração de dois sinais fluorescentes refere-se ao genótipo heterocigoto.

Gráficos que retratam as curvas de amplificação e a discriminação alélica estão mostrados na Figura 1.

**Figura 1 – Gráficos representativos das PCRs em tempo real para a análise de polimorfismos**



**Gráficos retratando o polimorfismo de VPAC2 3263 (C/T).** A- Curva de amplificação: azul: (FAM) – alelo C; verde (VIC) - alelo T – Discriminação alélica: homocigoto FAM (círculos alaranjados - CC), homocigoto VIC (quadrados azuis - TT), heterocigoto (triângulos verdes - CT), controle positivo (quadrado roxo) e controle negativo (losango preto).

#### 4.5 Análises Estatísticas

Diferenças dos níveis plasmáticos de VIP entre os grupos foram avaliados usando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Análises de correlação para a expressão de VIP e os valores de FEVE e DDVE foram realizados utilizando regressão linear e o teste de correlação de Pearson. O teste do  $X^2$  foi utilizado para detecção do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. O *Odds Ratio* (OR) foi calculado considerando-se um intervalo de confiança (IC) de 95%.

Análises estatísticas dos dados foram realizadas através do *software* estatístico GraphPad Prism (versão 5.01; San Diego, CA) e do *software* estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS versão 12.0 – IBM corporation, NY, USA). O nível de significância definido foi de  $p < 0.05$ . Para a conferência do desequilíbrio de ligação e formação de haplótipos entre os polimorfismos estudados foi utilizado o programa Haploview JRE 4.2.(USA)

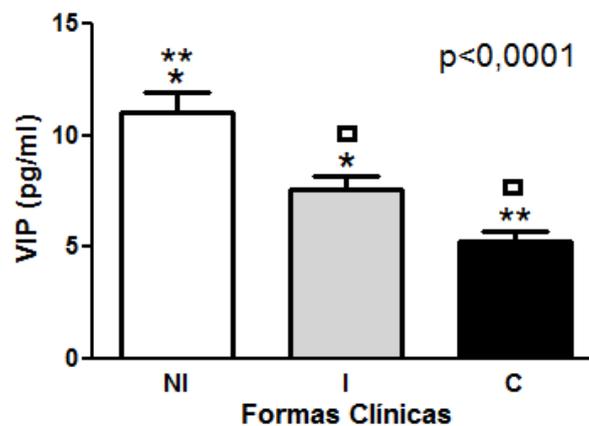


## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise dos níveis plasmáticos de VIP

A análise dos níveis plasmáticos de VIP revelou que os indivíduos não infectados apresentaram maiores níveis plasmáticos de VIP ( $11,04 \pm 4,6$  pg/ml) quando comparados aos pacientes com a forma clínica indeterminada ( $7,57 \pm 3,3$  pg/ml) e aos pacientes cardiopatas ( $5,22 \pm 2,4$  pg/ml), como pode ser visualizado pela figura 2. A comparação dos níveis plasmáticos de VIP entre grupos chagásicos revelou que pacientes cardíacos apresentam níveis significativamente menores desse neuropeptídeo ( $5,22 \pm 2,4$  pg/ml) quando comparados com indivíduos indeterminados ( $7,57 \pm 3,3$  pg/ml).

**Figura 2 – Níveis plasmáticos de VIP**



Os níveis plasmáticos de VIP foram avaliados em indivíduos não infectados NI (n=28), em pacientes com a forma clínica indeterminada I (n=26) e em pacientes com cardiopatia dilatada C (n=26). Dados são mostrados como média  $\pm$  SD. Valores de probabilidade foram calculados usando o teste Kruskal–Wallis com  $P < 0,05$ . Símbolos idênticos acima das barras representam diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

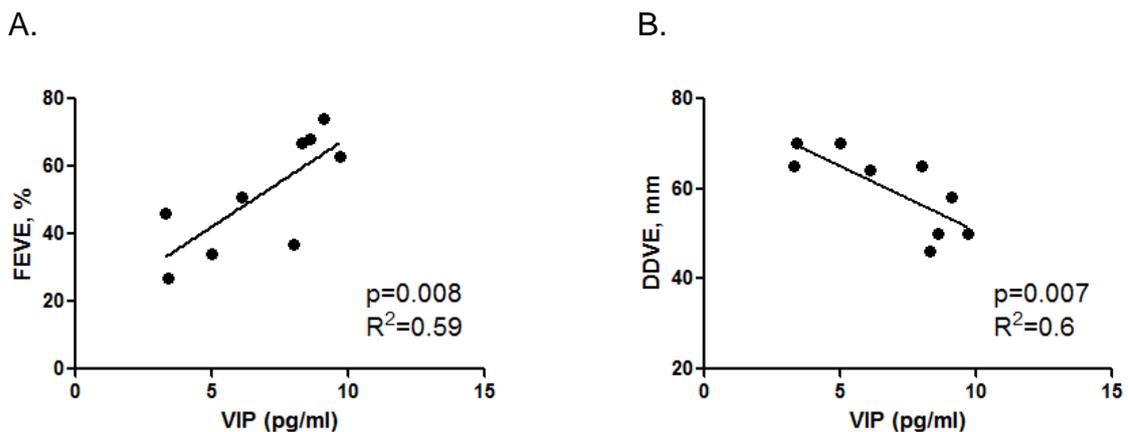
### 5.2 Correlações entre níveis plasmáticos de VIP e parâmetros clínicos

Conforme observada a associação entre menores níveis plasmáticos de VIP e a forma cardíaca da doença de Chagas, a existência de correlações entre os níveis plasmáticos de VIP e os parâmetros clínicos de fração de ejeção do ventrículo

esquerdo (FEVE) e de diâmetro ventricular diastólico esquerdo (DDVE) foram investigadas. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo corresponde à porcentagem de sangue bombeado pelo coração a cada batimento. Os valores de FEVE são obtidos pela relação entre volume sistólico e volume diastólico final, de modo que valores acima de 50% são considerados normais (MESQUITA e JORGE, 2009). O diâmetro ventricular diastólico esquerdo é aferido no final da diástole e valores até 55 mm são considerados normais (TEIXEIRA et al., 2011). Os parâmetros clínicos FEVE e DDVE são diretamente e inversamente relacionados com o melhor funcionamento cardíaco, respectivamente.

Obteve-se uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de VIP e os valores de FEVE (Figura 3a). Desta forma, quanto maior os níveis plasmáticos de VIP, maiores são os valores percentuais de fração de ejeção (Figura 3a). Os menores níveis plasmáticos de VIP correlacionaram-se negativamente com altos valores de DDVE (Figura 3b). Assim, quanto menor os níveis plasmáticos de VIP, maiores os valores, em milímetros, do diâmetro diastólico ventricular esquerdo (Figura 3b).

**Figura 3- Correlações entre níveis plasmáticos de VIP e parâmetros clínicos.**



Gráficos representativos das correlações entre níveis plasmáticos de VIP e parâmetros clínicos (n=9) através do teste de correlação de Pearson. A- Correlação entre os níveis plasmáticos de VIP dos indivíduos portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca e o parâmetro clínico FEVE. B- Correlação entre os níveis plasmáticos de VIP dos indivíduos portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca e o parâmetro clínico DDVE.

### 5.3 Análises de polimorfismos

Inicialmente foi realizado o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* que analisa a frequência dos genótipos esperada *versus* a observada na população em estudo. Levando em consideração o nível de significância de 5% e grau de liberdade igual a 1, os valores de  $X^2$  inferiores a 3,84 indicam que a população está em equilíbrio. Os resultados desta análise estão mostrados na Tabela 5. Conforme pode ser observado, a população em estudo encontra-se em equilíbrio para os quatro polimorfismos dos receptores de VIP.

**Tabela 5 – Equilíbrio de *Hardy-Weinberg***

Polimorfismo	$X^2$	Valor de P
rs 342511	0,0239	0,8771
rs 897	0,1526	0,6961
rs 2098349	0,2340	0,6286
rs 885861	0,1967	0,6574

#### 5.3.1 Polimorfismo VPAC1 2234 T/C (rs 342511)

O polimorfismo rs 342511 refere-se à troca de base de T para C no receptor de VIP, VPAC1, na região 3' UTR. A genotipagem deste polimorfismo nos diferentes grupos de estudo está demonstrada na Tabela 6.

A comparação entre os três genótipos TT, TC e CC não apresentou resultado estatisticamente significativo quando foram comparados os grupos de pacientes indeterminados (I) com cardíacos (C) ( $X^2=5,45$ ;  $p=0,065$ ) e chagásicos (I+C) com indivíduos não infectados (NI) ( $X^2=3,82$ ;  $p=0,148$ ). Apesar de não ser encontrado resultado estatístico significativo, os valores das frequências genotípicas demonstraram que o genótipo homocigoto selvagem TT foi mais frequente nos pacientes chagásicos (I+C) quando comparados aos indivíduos NI, deste modo, os indivíduos estudados apresentaram frequências do genótipo homocigoto TT de 45,1%, 42,1% e 27,5% para os grupos I, C e NI, respectivamente. Embora o grupo NI tenha apresentado percentual mais alto do genótipo heterocigoto TC com uma frequência de 60% quando comparado aos grupos I e C com as respectivas frequências de 49% e 36,8%, estes valores não foram significativamente diferentes.

Em relação ao genótipo polimórfico CC, houve uma baixa frequência na população amostral, sendo mais presente nos pacientes C com uma frequência de 21,1% quando comparados aos grupos I e NI com frequências de 5,9% e 12,5% respectivamente, não sendo encontrado resultado estatisticamente significativo entre os grupos (Tabela 6).

**Tabela 6 - Frequências genotípicas e dos alelos para VPAC1 2234 (T/C)**

	Indeterminado (I) n= 51	Cardíaco (C) n= 57	Chagásico (Chag) n= 108	Não infectado (NI) n= 40	OR	P
<b>Genótipos</b>						
TT	23 (45.1%)	24 (42.1%)	47 (43.5%)	11 (27.5%)		IxC:
TC	25 (49.0%)	21 (36.8%)	46 (42.6%)	24 (60.0%)	N.S	0,065
CC	3 (5.9%)	12 (21.1%)	15 (13.9%)	5 (12.5%)		ChagxNI: 0,148
<b>Presença/Ausência</b>						
T+ (TT+TC)	48 (94.1%)	45 (78.9%)	93 (86.1%)	35 (87.5%)	Cxl: 4,27 (1,13-16,2)	<b>0,023</b>
T- (CC)	3 (5.9%)	12 (21.1%)	15 (13.9%)	5 (12.5%)	ChagxNI:0,886 (0,30-2,62)	0,826
C+ (CC+TC)	28 (54.9%)	33 (57.9%)	61 (56.5%)	29 (72.5%)	Cxl: 0,885 (0,41-1,89)	0,724
C- (TT)	23 (45.1%)	24 (42.1%)	47 (43.5%)	11 (27.5%)	ChagxNI:0,492 (0,22-1,08)	0,076
<b>Alelos</b>						
C	31 (30.4%)	45 (39.5%)	76 (35.2%)	34 (42.5%)	Cxl: 0,67 (0,38-1,17)	0,162
T	71 (69.6%)	69 (60.5%)	140 (64.8%)	46 (57.5%)	ChagxNI:0,734 (0,43-1,24)	0,247

Foi executada a análise comparando-se a presença e ausência dos alelos T e C entre os grupos I e C, sendo observada uma diferença estatística em relação à presença (T+) e ausência (T-) do alelo T entre estes grupos. A presença do alelo T foi significativamente maior no grupo I comparado ao grupo C ( $p=0,023$ ). Nesta

análise foi observada que os portadores do alelo T possuem 4 vezes mais chance de desenvolver a forma indeterminada quando comparado com o grupo C, de cardiopatas ( $X^2=5,17$ ;  $OR=4,26$ ;  $p=0,023$ ;  $IC=1,130-16,115$ ). Não foi observada nenhuma diferença estatística em relação à análise da presença e ausência da variante C entre os grupos analisados (Tabela 6).

Foi realizada também a análise da frequência alélica, em que se observou que o alelo polimórfico C estava frequente em 30,4% no grupo I, 39,5% no grupo C e em 72,5% no grupo NI, enquanto o alelo T apresentou frequências de 69,6%, 60,5% e 57,5% nos grupos I, C, e NI, respectivamente. Entretanto, apesar do alelo T apresentar uma maior predominância nos indivíduos NI em comparação com os pacientes I e C, não foi demonstrada diferenças estatísticas entre os grupos estudados (Tabela 6).

### **5.3.2 Polimorfismo VPAC1 2028 C/T (rs 897)**

Os estudos alélicos do polimorfismo no receptor de VIP, VPAC1 2028, (3'UTR C/T) nos diferentes grupos estão apresentados na Tabela 7.

A comparação dos três genótipos, CC, CT, TT nos grupos distintos não exibiu resultado estatisticamente significativo quando comparamos os grupos indeterminado com cardíaco ( $X^2=1,96$ ;  $p=0,375$ ) e chagásico com controle ( $X^2=3,09$ ;  $p=0,213$ ), conforme apresentado na Tabela 7.

A análise comparando a presença e a ausência dos alelos C e T entre os grupos também não apresentou resultados estatísticos significativos. A presença do alelo C (C+) obteve frequências de 94,1%, 86% e 90% nos grupos I, C e NI, respectivamente. Em relação à ausência do alelo C (C-) foram encontrados valores de 5,9%, 14% e 10% nos grupos I, C e NI, respectivamente. Para a presença do alelo polimórfico T (T+) foram encontradas as seguintes frequências: 45,1% para o grupo I, 49,1% para os pacientes cardiopatas e 62,5% para os indivíduos NI. Analisando a ausência do alelo polimórfico T (T-) foram obtidas os valores de 54,9%, 50,9% e 37,5% para os grupos I, C e NI, respectivamente, não encontrando nenhuma diferença estatística (Tabela 7).

Em relação à frequência alélica, representada pelos alelos C e T, ao se comparar os grupos indeterminado com cardíaco ( $X^2=0,97$ ;  $p=0,323$ ) e chagásico

com controle ( $X^2=1,56$ ;  $p=0,211$ ) não foram encontradas diferenças estatísticas significativas (Tabela 7).

**Tabela 7 - Frequências genótípicas e dos alelos para VPAC1 2028 (C/T)**

	Indeterminado (I) n= 51	Cardíaco (C) n= 57	Chagásico (Chag) n= 108	Não infectado (NI) n= 40	OR	P
<b>Genótipos</b>						
CC	28 (54,9%)	29 (50,9%)	57 (52,8%)	15 (37,5%)		IxC:
CT	20 (39,2%)	20 (35,1%)	40 (37%)	21 (52,5%)	N.S	0,375
TT	3 (5,9%)	8 (14%)	11 (10,2%)	4 (10%)		ChagxNI: 0,213
<b>Presença/Ausência</b>						
C+ (CC+CT)	48 (94,1%)	49 (86%)	97 (89,8%)	36 (90%)	IxC: 2,612 (0,65-10,4)	0,162
C- (TT)	3 (5,9%)	8 (14%)	11 (10,2%)	4 (10%)	ChagxNI:0,98 (0,29-3,27)	0,974
T+ (CT+TT)	23 (45,1%)	28 (49,1%)	51 (47,2%)	25 (62,5%)	IxC:0,851 (0,40-1,81)	0,676
T- (CC)	28 (54,9%)	29 (50,9%)	57 (52,8%)	15 (37,5%)	ChagxNI:0,537 (0,25-1,12)	0,099
<b>Alelos</b>						
C	76 (74,5%)	78 (68,5%)	154 (71,3%)	51 (63,7%)	IxC: 0,741 (0,40-1,34)	0,323
T	26 (25,5%)	36 (31,6%)	62 (28,7%)	29 (36,3%)	ChagxNI: 0,70 (0,41-1,21)	0,211

### 5.3.3 Polimorfismo VPAC2 579 G/T (rs 2098349)

A genotipagem do polimorfismo no receptor de VIP, VPAC2 579 (G/T) nos diferentes grupos está apresentada na Tabela 8.

Ao comparar os três genótipos (GG, GT e TT) nos diferentes grupos não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. Observamos, no entanto, que o genótipo homocigoto selvagem (GG) apresentou mesma frequência nos

grupos I e C com valor de 66,7% e se aproximou do grupo NI com um valor de 67,5% (Tabela 8).

**Tabela 8 - Frequências genótípicas e dos alelos para VPAC2 579 (G/T)**

	Indeterminado (I) n= 51	Cardíaco (C) n= 57	Chagásico (Chag) n= 108	Não infectado (NI) n= 40	OR	P
<b>Genótipos</b>						
<b>GG</b>	34 (66,7%)	38 (66,7%)	72 (66,7%)	27 (67,5%)		IxC:
<b>GT</b>	15 (29,4%)	16 (28,1%)	31 (28,7%)	12 (30%)	N.S	0,941
<b>TT</b>	2 (3,9%)	3 (5,3%)	5 (4,6%)	1 (2,5%)		ChagxNI: 0,841
<b>Presença/Ausência</b>						
<b>G+ (GG+GT)</b>	49 (96.1%)	54 (94,7%)	103 (95,4%)	39 (97,5%)	IxC:1,36 (0,21-8,48)	0,740
<b>G- (TT)</b>	2 (3,9%)	3 (5,3%)	5 (4,6%)	1 (2,5%)	ChagxNI:0,52 (0,06-4,66)	0,560
<b>T+ (GT+TT)</b>	17 (33,3%)	19 (33,3%)	36 (33,3%)	13 (32,5%)	IxC: 1 (0,44-2,22)	1
<b>T- (GG)</b>	34 (66,7%)	38 (66,7%)	72 (66,7%)	27 (67,5%)	ChagxNI:1,03 (0,47-2,25)	0,924
<b>Alelos</b>						
<b>G</b>	83 (81,4%)	92 (80,7%)	175 (81%)	66 (82,5%)	IxC: 0,95 (0,48-1,89)	0,9001
<b>T</b>	19 (18,66%)	22 (19,3%)	41 (19%)	14 (17,5%)	ChagxNI:1,10 (0,56-2,15)	0,7710

Ao comparar a presença da variante alélica (T+) obteve-se a mesma porcentagem de frequência para os grupos I e C, no valor de 33,3% que se aproximou do grupo NI com um valor de 32,5%. Semelhantemente, na análise da ausência da variante alélica (T-) foram obtidos valores de 66,7% para os grupos I e C e de 67,5% para os indivíduos NI. Dessa forma, não houve diferença estatística para a presença ou ausência da variante alélica entre os grupos analisados. Resultados semelhantes foram observados em relação à presença e ausência do alelo G, no qual os percentuais aproximaram-se. Para a presença do alelo G (G+),

foram encontrados os valores 96,1%, 94,7%, 97,5% para os grupos I, C e NI, respectivamente. Na ausência deste alelo (G-), as porcentagens obtidas foram 3,9% para o grupo I, 5,3% para o grupo C e 2,5% para o grupo NI (Tabela 8).

Na análise da frequência alélica não foram encontrados resultados estatísticos significativos, conforme mostrado na Tabela 8.

### 5.3.4 Polimorfismo VPAC2 3263 C/T (rs 885861)

Os estudos alélicos do polimorfismo no receptor de VIP, VPAC2 3263 (3' UTR C/T) nos diferentes grupos estão expressos na Tabela 9.

**Tabela 9- Frequências genótípicas e dos alelos para VPAC2 3263 (C/T)**

	Indeterminado (I) n= 51	Cardíaco (C) n= 57	Chagásico (Chag) n= 108	Não infectado (NI) n= 40	OR	P
<b>Genótipos</b>						
CC	20 (39,2%)	21 (36,8%)	41 (38%)	8 (20%)		IxC
CT	24 (47,1%)	24 (42,1%)	48 (44,4%)	22 (55%)	N.S	0,604
TT	7 (13,7%)	12 (21,1%)	19 (17,6%)	10 (25%)		ChagxNI 0,114
<b>Presença/Ausência</b>						
C+ (CC+CT)	44 (86,3%)	45 (78,9%)	89 (82,4%)	30 (75,5%)	IxC: 1,676	0,318
C- (TT)	7 (13,7%)	12 (21,1%)	19 (17,6%)	10 (25%)	(0,60-4,65) ChagxNI:1,56 (0,65-3,73)	0,313
T+ (CT+TT)	31 (60,8%)	36 (63,2%)	67 (62%)	32 (80%)	IxC :0,904	0,800
T- (CC)	20 (39,2%)	21 (36,8%)	41 (38%)	8 (20%)	(0,41-1,96) NIxChag:2,45 (1,03-5,86)	<b>0,0392</b>
<b>Alelos</b>						
C	64 (62,5%)	66 (57,9%)	130 (60,2%)	38 (47,5%)	IxC: 0,8164	0,4672
T	38 (37,3%)	48 (42,1%)	86 (39,8%)	42 (52,5%)	(0,47-1,41) ChagxNI:0,60 (0,35-1,003)	0,0504

Apesar do genótipo CC ser quase duas vezes mais frequente no grupo chagásico quando comparado ao grupo NI, com valores de 38% e 20%, respectivamente e o genótipo polimórfico TT possuir uma menor frequência no grupo I com frequência de 13,7% quando comparado com os indivíduos NI com frequência de 25%, possuindo uma diferença de percentual de 11,3%, não foi revelado nenhum resultado estatístico significativo ao comparar os três genótipos nos diferentes grupos (Tabela 9).

Foi realizada a análise comparando-se a presença e ausência do alelo C e da variante alélica T entre os diferentes grupos. Não foi encontrada diferença estatística ao verificar a presença (C+)/ausência (C-) do alelo C entre os grupos. A presença do alelo C (C+) possuiu frequências de 86,3%, 78,9% e 82,4% para os grupos I, C e NI, respectivamente. Em relação à presença (T+) da variante foram encontrados os seguintes valores: 60,8%, 63,2% e 80% para os grupos I, C e NI, nessa ordem. Para a ausência (T-) desta, foram obtidos os valores 39,2%, 36,8% e 20% para os grupos I, C e NI, respectivamente. Com isso, observou-se que os pacientes chagásicos têm menor frequência da variante T em relação aos indivíduos saudáveis ( $X^2=4,25$ ;  $OR=2,4478$ ;  $p=0,0392$ ;  $IC=1,0288-5,8237$ ) (Tabela 9).

Ao analisar as frequências alélicas não foi verificada nenhuma associação estatisticamente significativa. O alelo C obteve frequências de 62,7%, 57,9% e 47,5% para os grupos I, C e NI, respectivamente. Já os valores encontrados para a variante T foram 37,3%, 42,1% e 52,5% para os grupos I, C e NI, nessa ordem, conforme exibido na Tabela 9.

#### **5.4 Análise do desequilíbrio de ligação e formação de haplótipos**

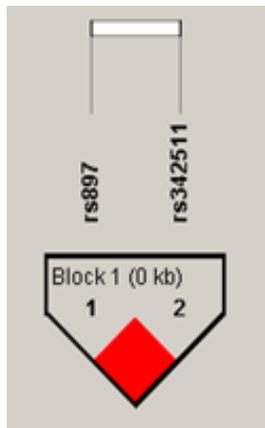
Considerando que os polimorfismos rs 342511 e rs 897 referentes ao receptor VPAC1 estão localizados no mesmo cromossomo (Cr-3) e os polimorfismos de VPAC2, rs 2098349 e rs 885861, também estão localizados em mesmo cromossomo (Cr-7), foi realizada a avaliação de formação de haplótipos e análise de desequilíbrio de ligação separadamente.

O termo “haplótipo” (genótipo haploide) refere-se à combinação de alelos em diferentes loci no cromossomo que são transmitidos juntos. O grau de associação entre dois polimorfismos pode ser medido através de métodos estatísticos e indicar

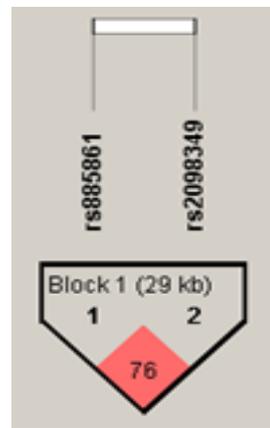
se estão em desequilíbrio de ligação, ou seja, se formam uma estrutura haplotípica (ZHAO et al., 2003). Valores de  $D' \leq 1$  e valores de  $LOD > 2$  indicam forte tendência a desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados.  $D'$  significa coeficiente de correlação entre pares de loci e  $LOD$  é o log da probabilidade da razão de chance. Os resultados dessas análises realizadas pelo programa *Haploview* demonstraram que os dois polimorfismos relacionados à VPAC1 ( $D'=1$  e  $LOD=40,18$ ) e os dois referentes à VPAC2 ( $D'= 0,76$  e  $LOD=4,61$ ) formam haplótipos e, portanto, estão em desequilíbrio de ligação (Figura 4).

**Figura 4 – Análise do desequilíbrio de ligação**

A.



B.



Estruturas representativas do desequilíbrio de ligação nos SNPs rs 342511 e rs 897 presentes no receptor VPAC1 (A) e nos SNPs rs 885861 e rs 2098349 presentes no receptor VPAC2 (B). As estruturas foram montadas através do programa *Haploview* 4.2. Quanto mais forte o tom de vermelho demonstrado pela figura, maior a ligação de desequilíbrio entre os SNPS (figuras brancas ou vermelho claro indicam fraca tendência a desequilíbrio de ligação). O número na caixa representa o valor de  $D'$  e a caixas vazia indica completo desequilíbrio.



## 6. DISCUSSÃO

Embora a doença de Chagas assuma diferentes formas clínicas, variando de uma forma assintomática à cardiopatia dilatada, ainda não se sabe ao certo os fatores que levam a essa evolução clínica diferencial em indivíduos infectados (NASCIMENTO et al., 2011). A forma clínica indeterminada é considerada uma forma relativamente mais suave da doença, sendo caracterizada pela ausência de sintomas e sinais clínicos, representando um período dramático de co-adaptação entre o hospedeiro e o parasito (RIBEIRO; ROCHA, 1998; DUTRA et al., 2009). A cardiomiopatia chagásica afeta aproximadamente 2 milhões de pessoas na América Latina e resulta em 12.500 mortes por ano, devido a problemas cardíacos (RASSI et al., 2010). A cardiomiopatia é caracterizada por infiltrados inflamatórios focais ou disseminados e fibrose progressiva, resultando em danos da matriz extracelular e substituição dos cardiomiócitos e células vasculares por tecido fibroso, com remodelamento do miocárdio e da vasculatura (ANDRADE; LOPES, 1963). Sabe-se que o sistema imune do hospedeiro é fundamental para controlar a parasitemia durante a forma aguda da doença de Chagas, entretanto, uma resposta imunológica exacerbada pode levar a danos teciduais responsáveis por essa cardiopatia; além disso, fatores genéticos do hospedeiro, e fatores associados ao parasito também contribuem para o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica (WHO, 2002; DUTRA et al., 2009).

Os sistemas neuroendócrino e imune interagem, controlando-se mutuamente, através da liberação de mediadores neuroimunes, influenciando a regulação inflamatória. O sistema imune influencia as atividades do sistema neuroendócrino, assim como sofre influências do sistema neuroendócrino que estimula ou inibe suas atividades (BRODGEN et al., 2005). O neuropeptídeo, VIP, possui ampla distribuição no corpo, e é um dos fatores endógenos envolvidos na manutenção da tolerância imune, exibindo potente atividade anti-inflamatória que afeta os sistemas imune inato e adaptativo (POZO et al., 2007). A ação de VIP se dá através de dois receptores acoplados à proteína G, VPAC1 e VPAC2, que possuem afinidades similares para esse peptídeo (Delgado et al, 2004).

Com base no exposto, trabalhamos com a hipótese de que alterações dos níveis plasmáticos desse peptídeo, bem como a ocorrência de polimorfismos

genéticos de seus receptores, poderiam estar envolvidos com o desenvolvimento da cardiomiopatia em pacientes chagásicos crônicos.

Em relação à análise dos níveis plasmáticos de VIP em pacientes das formas assintomática e cardíaca da doença de Chagas observamos que os pacientes que possuíam a forma cardíaca dilatada da doença apresentaram menores níveis plasmáticos de VIP quando comparados aos indivíduos com forma clínica indeterminada e com o grupo de indivíduos não chagásicos. Corroborando com nossos resultados, estudos em humanos também retratam uma diminuição da expressão de VIP e/ou de resposta a VIP em diferentes quadros inflamatórios crônicos. Em um estudo realizado por Juarranz e colaboradores (2008), foi observado que a expressão do RNAm de VIP foi dez vezes menor nos sinoviócitos de pacientes com AR quando comparado com sinoviócitos de pacientes com osteoartrite. Em outro estudo relacionado à esclerose múltipla, foi observado que as células T desses pacientes foram menos responsivas ao VIP endógeno e exógeno do que as células derivadas de indivíduos saudáveis. (SUN et al., 2006). Dados referentes ao funcionamento de VIP na doença de Chagas são faltosos na literatura. Apenas quatro trabalhos retratam VIP nessa patologia, sendo um realizado em modelo murino (MAIFRINO et al., 1999) e três em humanos, todos relacionados ao megacólon chagásico (DA SILVEIRA et al., 2007; JABARI et al., 2012 a e b). No trabalho utilizando-se a infecção experimental de camundongos pelo *T. cruzi*, foi observado que estes animais infectados apresentaram poucas vesículas granulares grandes em seus axônios, podendo levar a uma diminuição da síntese de mediadores químicos e que as fibras nervosas positivas para VIP e para a substância P no plexo mioentérico foram reduzidas em relação ao observado em camundongos controle. A redução da atividade de VIP pode estar relacionada a distúrbios na mobilidade intestinal observada na fase crônica da doença de Chagas (MAIFRINO, et al., 1999). No estudo caracterizando neurônios expressando VIP no sistema nervoso entérico de pacientes chagásicos com megacólon foi revelado que neurônios motores inibitórios expressando este peptídeo são preferencialmente destruídos pelo *T. cruzi* e/ou pelo processo inflamatório. A depleção de neurônios contendo VIP pode impedir o relaxamento do músculo liso no cólon danificado desses pacientes (DA SILVEIRA et al., 2007). Em trabalho recente, desenvolvido por Jabari e colaboradores (2012a) foi observada uma diminuição do número de

neurônios na submucosa e uma diminuição da densidade das fibras nervosas dos segmentos do megacólon chagásico. Essa neurodegeneração no plexo da submucosa parece ser moderada. Uma similaridade entre os plexos submucosos externo e interno no intestino chagásico é a sobrevivência parcial seletiva de elementos nervosos. Na mucosa e submucosa, neurônios imunorreativos para calretinina, assim como as fibras nervosas possuem maior sobrevivência em comparação com aqueles imunorreativos para somastatina. Foi testado e descoberto que VIP é amplamente colocalizado com a calretinina nas fibras nervosas da mucosa e submucosa. Neurônios imunorreativos para a calretinina suportam estruturas vitais e funcionam mantendo a barreira da mucosa. VIP, produzido pelos neurônios da submucosa, têm mostrado exercer ações protetivas nas células e estruturas da mucosa (NEUNLIST et al., 2003; TOUMI et al., 2003). Dessa forma, sugere-se que VIP possa proteger os neurônios imunorreativos para VIP/calretinina da morte celular, permitindo pacientes sobreviverem por décadas, apesar da mobilidade perturbada do cólon. Em outro estudo, também realizado por Jabari e colaboradores (2012b) foi verificada uma menor densidade das fibras nervosas localizadas nas camadas muscular e longitudinal do megacólon chagásico quando comparado com indivíduos saudáveis, isso pode ser devido à degeneração massiva de neurônios mioentéricos. A maioria dos neurônios sobreviventes foram os nitrérgicos quando comparado aos neurônios colinérgicos. Além disso, as proporções de nervos intramusculares inibitórios (imunorreativos para NOS, VIP ou NOS/VIP) foram aumentadas nos segmentos do megacólon chagásico em relação ao controle. Esse estudo também revelou uma alta proporção de neurônios possuindo a co-localização de VIP e NOS, e juntos, possuem uma influência inibitória no músculo liso do intestino. Foi sugerido que a predominância de nervos inibitórios deve ser um fator de explicação para a dilatação crônica no megacólon chagásico humano.

Atualmente, não existem dados na literatura relacionando o peptídeo intestinal vasoativo e as formas indeterminada e cardíaca na doença de Chagas. Dessa forma, no presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez, uma diminuição da expressão de VIP em pacientes chagásicos apresentando cardiomiopatia quando comparado com indivíduos da forma indeterminada e saudáveis. Reciprocamente, altos níveis de VIP foram correlacionados com altos valores de FEVE e baixos

valores de DDVE os quais foram relacionados ao melhor prognóstico para a doença de Chagas. Manifestações cardíacas da doença de Chagas podem ser atribuídas a muitos fatores, incluindo persistência do parasito, sistema vascular prejudicado, destruição dos gânglios do sistema nervoso autonômico e autoimunidade (KIERSZENBAUM, 2005). A cardiomiopatia chagásica crônica é caracterizada pela presença de um intenso infiltrado inflamatório composto principalmente de células T CD8<sup>+</sup> no miocárdio dos pacientes, sendo que essas células são associadas com a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas citotóxicas (REIS et al., 1993). Costa e colaboradores (2009) observaram que altos níveis de IL-10 também obtiveram uma correlação com altos valores de FEVE, relacionados ao melhor funcionamento cardíaco na doença de Chagas. Nossos dados sugerem que a expressão de VIP pode ser um dos fatores que desempenham importante papel na doença de Chagas, podendo apresentar um efeito protetor contra o desenvolvimento da patogênese cardíaca. Algumas hipóteses para explicar a diminuição da expressão de VIP em pacientes chagásicos poderiam estar relacionadas à diminuição da expressão do RNAm de VIP (JUARRANZ et al., 2008), ou à existência de altas quantidades de auto-anticorpos ou enzimas com atividade VIPase em pacientes portadores da forma clínica cardíaca, já que VIPases induzem distúrbios imunorregulatórios e já foram relatados em outros quadros patológicos (BANGALE et al., 2003). A avaliação dos mecanismos responsáveis pela diminuição de VIP em pacientes chagásicos, especialmente, cardiopatas, precisa ser investigada e faz parte das perspectivas de continuidade deste trabalho.

Uma vez que os polimorfismos genéticos podem acarretar alterações da expressão de proteínas, decidimos investigar a ocorrência de polimorfismos dos receptores VPAC1 e VPAC2 que pudessem estar correlacionados ao desenvolvimento das diferentes formas clínicas avaliadas neste estudo. Baseado nesse pressuposto, foram analisados quatro polimorfismos, dois referentes ao receptor VPAC1 (rs 342511 e rs 897), ambos localizados no cromossomo 3 e os outros dois referentes ao receptor VPAC2 (rs 2098349 e rs 88586), encontrados no cromossomo 7. Todos os polimorfismos estão situados na região 3'UTR. Essa região apresenta relevância na regulação da expressão gênica podendo modular a tolerância em doenças inflamatórias (SOTGIU et al., 2007). A presença de SNPs dentro dessa região regulatória do genoma pode resultar em alterações da

transcrição gênica e, conseqüentemente, (CHORLEY et al., 2008), alterações da expressão de ambos receptores de VIP; seja pelo impedimento de ligação de fatores de transcrição ou ainda, pelo reconhecimento de sítios parcialmente complementares nessa região por microRNAs, o que levaria à regulação da produção dos transcritos alvos (SCHERR e EDER, 2007; BEHM-ANSMANT et al., 2006).

Nossos dados revelaram uma associação entre o polimorfismo rs 342511 (T/C) e o desenvolvimento da forma assintomática da doença de Chagas, mais especificamente, que a presença do alelo T está associada ao desenvolvimento da forma clínica indeterminada. Nossos dados sugerem que a presença do alelo T nesta patogênese possui um papel protetor relacionado ao desenvolvimento da forma cardíaca da doença, já que o mesmo foi relacionado com uma maior chance de desenvolvimento da forma clínica indeterminada.

Recentemente, este mesmo polimorfismo apresentou uma associação significativa com a susceptibilidade à artrite reumatóide. Entretanto, o genótipo homozigoto TT foi mais frequente nos pacientes artríticos quando comparado com indivíduos saudáveis. Além disso, seis SNPs (rs 7636205, rs 897, rs 896, rs 342511 e rs 8913) presentes na região 3'UTR de VPAC1 mostraram forte desequilíbrio de ligação, apresentando um bloco de haplótipos definido. Interessantemente, o haplótipo ACCCAC foi significativamente associado à predisposição à AR, enquanto o haplótipo ATTTGT mostrou um efeito protetor. Porém, diferenças entre esses dois haplótipos em termos da expressão de VPAC1 ou produção de AMP cíclico induzida pelo VIP em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AR não foram observados. Finalmente, ao investigar a relação entre a expressão alterada de VPAC1 e os diferentes haplótipos em células sinoviais isoladas de pacientes com AR observou-se que fibroblastos sinoviais desses pacientes com o haplótipo protetor ATTTGT mostraram um aumento da expressão de VPAC1 e da porcentagem de células ativadas positivas para este receptor. Em contraste, a expressão de VPAC1 foi levemente reduzida em fibroblastos sinoviais de pacientes artríticos com haplótipo de predisposição. Assim, VIP reduziu a produção de citocinas inflamatórias nas células sinoviais ativadas de pacientes com o haplótipo ATTTGT, mas não em fibroblastos sinoviais de pacientes com outros haplótipos. Essas descobertas apoiam a noção que o haplótipo ATTTGT esteja associado ao aumento da

expressão de VPAC1 nas células inflamatórias sinoviais ativadas (DELGADO et al., 2008). As análises de haplótipos entre os SNPs presentes na região 3'UTR do gene de VPAC1, rs 342511 e rs 897, nas células de pacientes chagásicos, apresentaram desequilíbrio de ligação, semelhantemente aos dados observados em pacientes com AR (DELGADO et al., 2008), em que estes polimorfismos formavam haplótipo associado à predisposição a AR (DELGADO et., 2008). A expansão dos estudos de polimorfismos do receptor VPAC1 são necessários para verificação da existência de blocos de haplótipos mais complexos que sejam relacionados ao desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Em relação ao polimorfismo rs 897 (C/T), nossos resultados indicam que apesar do alelo C ser muito frequente nos participantes deste estudo, não foi observada nenhuma associação deste polimorfismo com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas.

Os polimorfismos rs 2098349 (G/T) e rs 885861 (C/T) presentes no receptor VPAC2, também foram analisados com o intuito de observar se estes poderiam influenciar a evolução de diferentes formas clínicas da doença de Chagas. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa para o polimorfismo rs 2098349 (G/T). Um fato que pôde ser observado foi que a presença e a ausência da variante T apresentaram as mesmas frequências para os grupos indeterminado e cardíaco e que essas frequências aproximaram-se do grupo controle. Estes resultados sugerem que este polimorfismo não está relacionado com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. O polimorfismo rs885861 (C/T) apresentou resultado estatístico significativo em relação à presença/ausência da variante T quando foram comparados os indivíduos não infectados com os pacientes chagásicos. Foi observado que a variante T foi mais frequente nos indivíduos não infectados, podendo sugerir que a ausência dessa variante nos indivíduos chagásicos pode ser um fator que predispõe à doença, embora não tenha sido encontrada diferença estatística significativa entre os grupos indeterminados e cardíacos. Análise da formação de haplótipos para os dois polimorfismos estudados, rs 2098349 e rs 885861, mostrou que eles se encontram em desequilíbrio de ligação, entretanto, a associação entre esses dois polimorfismos foi menor do que a observada para os polimorfismos de VPAC1. A ampliação dos estudos de formação

de blocos haplotípicos por SNPs de VPAC2 bem como sua relação com as formas clínicas da doença de Chagas precisam ser melhor investigados.

Apesar da existência de muitos trabalhos na literatura evidenciando a relevância dos receptores VPAC1 e VPAC2 (SZEMA et al., 2006; COLWELL et al., 2003; HAMIDI et al., 2008; DELGADO et al., 1999; MARTINEZ et al., 1998; HARMAR et al., 2002; GOETZL et al., 2000), poucos são relacionados a polimorfismos no receptor VPAC2. No trabalho desenvolvido por Sun e colaboradores (2006), foi observado que células T CD4<sup>+</sup> de pacientes com esclerose múltipla apresentaram expressão alterada do receptor VPAC2, então, estes pesquisadores, procuraram observar se isto estaria associado aos polimorfismos genéticos rs 2098349 e rs 885861. Não foi constatada nenhuma associação entre esses dois polimorfismos em relação às frequências alélicas e genotípicas na esclerose múltipla. Essa alteração na expressão de VPAC2 em pacientes com esclerose múltipla pareceu estar associada com a regulação anômala de ligação dos fatores de transcrição como GATA-3 e FOXD2 na região promotora do gene VPAC2, já que houve uma diminuição da expressão de ambos nas células T CD4<sup>+</sup> dos pacientes com esclerose múltipla quando comparados ao grupo controle. Esses dois fatores de transcrição estão envolvidos no controle da resposta Th1 e Th2 e na ativação de células T CD4<sup>+</sup> (SUNDRUD et al., 2003; JOHANSSON et al., 2003). Por outro lado, VACIC e colaboradores (2011) observaram associações de microduplicações presentes no cromossomo 7q36.3 de pacientes esquizofrênicos e que os linfócitos desses pacientes, em cultura, exibiram um significativo aumento da transcrição de VPAC2 e da sinalização de AMP cíclico, permitindo indicar que a transcrição de VPAC2 pode ser influenciada pelas duplicações do genoma. Estudos de outros polimorfismos no gene de VPAC2, a verificação da existência de microduplicações gênicas bem como a determinação da expressão de VPAC2 em células de indivíduos chagásicos permitirão uma maior compreensão do papel de VPAC2 na doença de Chagas.

A determinação das diferentes formas clínicas da doença de Chagas assume um caráter multifatorial, podendo ser atribuída à resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, assim como seu *background* genético e à presença do parasito (TARLETON, 2007). Acreditamos que o peptídeo intestinal vasoativo e seus receptores podem ser fatores de interferência no desenvolvimento dessas distintas

formas clínicas. É importante destacar que este estudo foi o primeiro a demonstrar a expressão diminuída de VIP em pacientes chagásicos apresentando cardiomiopatia; em adição, foi o primeiro estudo a avaliar polimorfismos nos receptores desse peptídeo no curso da doença de Chagas humana. Conforme observado pelos resultados encontrados, a expressão de VIP correlacionada ao funcionamento do coração e a ocorrência dos polimorfismos genéticos rs 342511 e rs 885861 nos receptores de VIP, VPAC1 e VPAC2, respectivamente, estão associados com o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas. A correlação entre SNPs, a expressão celular dos receptores de VIP e a resposta celular dos pacientes ao VIP devem ser investigados, sendo essas, nossas perspectivas futuras. Dessa forma, esperamos que este estudo possa contribuir para o esclarecimento da evolução de diferentes formas clínicas no contexto da doença de Chagas e para a compreensão dos papéis dos neuropeptídeos neste quadro patológico.



## 7. CONCLUSÕES

Através do presente estudo, pode-se concluir que pacientes que apresentam a forma clínica cardíaca da doença de Chagas apresentam menores níveis plasmáticos de VIP quando comparados aos pacientes indeterminados e aos indivíduos controle. O melhor funcionamento do coração foi avaliado pela FEVE e pelo DDVE, sendo que altos níveis de VIP foram correlacionados com altos valores de FEVE e baixos valores de DDVE, sugerindo o papel de VIP como protetor na patologia da doença de Chagas. Verificamos, ainda, que o alelo T do polimorfismo rs 342511 (T/C) na região 3'UTR no receptor VPAC1 está relacionado com o desenvolvimento da forma clínica indeterminada e que o alelo polimórfico T no polimorfismo rs 885861 (C/T) presente também na região 3'UTR do receptor VPAC2 é menos frequente nos grupos chagásicos quando comparados ao grupo controle; este dado pode levar à interpretação que esse polimorfismo esteja relacionado ao desenvolvimento da patologia chagásica.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD C. et al. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 124(4), p. 961-71, 2003.

ANDERSON, P., DELGADO, M. Endogenous anti-inflammatory neuropeptides and pro resolving lipid mediators: a new therapeutic approach for immune disorders. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, p. 1830–1847, 2008.

ANDERSON, P.; GONZALEZ-REY, E. Vasoactive intestinal peptide induces cell cycle arrest and regulatory functions in human T cells at multiple. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30(10), p. 2537-2551, 2010.

ANDRADE, Z. A.; LOPES, E. A. A histochemical study of experimental Chagas disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, p. 236-242, 1963.

BANGALE, Y. et al. VIPase autoantibodies in FAs-defective mice and patients with autoimmune disease. **FASEB Journal**, v. 17, p. 628-635, 2003.

BEHM-ANSMANT, I.; REHWINKEL, J.; IZAURRALDE, E. MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 71, p. 523-530, 2006.

BLUTHE, R. M. et al. Synergy between tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of sickness behavior in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19(2), p. 197-207, 1994.

BOOM R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BROGDEN, K.A. et al. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. **Nature Immunology**, v. 6, p. 558-564, 2005.

CALZADA, J. E. et al. Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. **Cytokine**, v. 45, p. 149–153, 2009.

CHORLEY, B. N. et al. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphism in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. **Mutatin Research**, v. 659, p. 147–157, 2008.

COLWELL, C. S. et al. Disrupted circadian rhythm in VIP- and PHI- deficient mice. **American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, p. 939-949, 2003.

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

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

DA SILVEIRA, A. B. et al. Neurochemical coding of the enteric nervous system in chagasic patients with megacolon. **Digestive Disease and Science**, v. 52, p. 2877-2883, 2007.

DE LA FUENTE, M.; DELGADO, M.; GOMARIZ, R.P. VIP modulation of immune cell functions. **Advances in Neuroimmunology**, v. 6, p. 75-91, 1996.

DELGADO, M. et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 1707–1716, 1999.

DELGADO, M. et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevent inducible nitric oxide synthase transcription in macrophages by inhibiting NF- $\kappa$ B and IFN regulatory factor 1 activation. **The Journal of Immunology**, v. 162(8), p. 4685-4696, 1996.

DELGADO, M. et al. Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells. **Arthritides & Rheumatism**, v. 58(4), p. 1010-1019, 2008.

DELGADO, M. et al. Neuropeptide kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing autophagic-like cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 406-416, 2009.

DELGADO, M.; GANEA, D. Anti-inflammatory neuropeptides: a new class of endogenous immunoregulatory agents. *Brain Behavior and Immunity*, v. 22, p. 1146-1151, 2008.

DELGADO, M.; POZO, D.; GANEA, D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. **Pharmacological Reviews**, v. 56, p. 249-290, 2004.

DE NARDIN, E. Genetic polymorphisms and immune responses. **Immunological Investigations**, v.38, p. 198-202, 2009.

DRIGO, S. A. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas disease cardiomyopathy patients. **Microbes and Infectious**, v. 8, p. 598-603, 2006.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 204-218, 2009.

FLOREZ, O. et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in Chagas disease in a Colombian case-control study. **Human Immunology**, v. 67, p. 741–748, 2006.

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

GOETZL, E. J. et al. Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate -type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC2receptor for vasoactive intestinal peptide. *Proceedings of the National Academy of sciences*, v. 98, p. 13854-13859, 2001.

GOMARIZ, R.P. et al. Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, p. 491-502, 2005.

GONZALEZ-REY, E.; DELGADO, M. Anti-inflammatory neuropeptide receptors: new therapeutic targets for immune disorders?. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, p. 482-491, 2007.

GONZALZ-REY, E. et al. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. **Blood**, v. 107, p. 3632-3638, 2006.

GOZES, I.; FURMAN, S. VIP and drug design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9(6), p. 483-494, 2003.

HAMIDI, S. A.; PRABHAKAR, S.; SAID, S.I. Enhancement of pulmonary vascular remodeling and inflammatory genes with VIP gene deletion. **European Respiratory Journal**, v. 31, p. 135-139, 2008.

HARMAR, A. J. et al. The VPAC2 receptor is essential for circadianfunction in the mouse suprachiasmatic nuclei. **Cell**, v. 109, p. 497-508, 2002.

HENNING, R.J.; SAWMILLER, D.R. Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. **Cardiovascular Research**, v. 49, p. 27-37, 2001.

HIDRON, A. I. et al. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4(5), p. e688, 2010.

HOKFELT, T.; BARTFAI, T.; BLOOM F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. **Lancet Neurology**, v. 2, p. 463-472, 2003.

ITOH, M. et al. Human preprovasactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. **Nature**, v.304, p. 547-549, 1983.

JUARRANZ, Y. et al. Differential expression of vasoactive intestinal peptideand its functional receptors in human osteoathritic and rheumatoid synovial fibroblasts. **Atrthritis & Rheumatism**, v. 58: 1086-1095, 2008.

JABARI, S. et al. Preponderance of inhibitory versus excitatory intramuscular nerve fibres in human chagasic megacolon. **International Journal of Colorectal diseases**, v. 27, p. 1181-1189, 2012b.

JABARI, S. et al. Selective survival of calretinin- and vasoactive intestinal peptide containing nerve elements in human chagasic submucosa and mucosa. **Cellular Tissue Research**, v. 349, p. 473-481, 2012a.

JOHANSSON, C. C. et al. A winged helix forkhead (FOXD2) tunes sensitivity to cAMP in T lymphocytes through regulation of cAMP-dependent protein kinase R1alpha. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p.e 17573.

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

LABURTHER, M.; COUNIVEAU, A.; MARIE, J.C. VPAC receptors for VIP and PACAP. **Receptors Channels**, v.8, p. 137-153, 2002.

LANGER, I.; ROBBERECHT, P. Molecular mechanisms involved in vasoactive intestinal peptide receptor activation and regulation: current knowledge, similarities to and differences from the A family of G-protein-coupled receptors. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 724-728, 2007.

MAIFRINO, B. M.; LIBERTI, E. A.; SOUZA, R. R. Vasoactive intestinal peptide and substance P – immunoreactive nerve fibres in the myenteric plexus of mouse colon during the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 93, p. 49-56, 1999.

MAKAY, M. et al. Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. **Genomics**, v. 37, p. e 345, 1996.

MARTINEZ, C. et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. **Journal Leucocyte Biology**, v. 63, p. 591-601, 1998.

MESQUITA, E. T.; JORGE, A. J. L. Insuficiência cardíaca com fração de ejeção normal.: novos critérios diagnósticos e avanços fisiopatológicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, p. 180-187, 2009.

NASCIMETO, B. R. et al. The prognostic significance of eletrocardiographic changes in Chagas disease. **Journal of Eletrocardiology**, v. 45, p. 43-48, 2011.

NEUNLIST, M. et al. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. **American Journal of Physiology- Gastrointestinal and liver**, v.285, p. 1028-1036, 2003.

POZO, D. et al. Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: a new therapeutic approach for immune disorders. **Peptides**, v.28(9), p. 1833-1846, 2007.

PRASSE A. et al. Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**, v. 182(4), p. 540-548, 2010.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 92–100, 2001.

POZO, D.; DELGADO, M. The many faces of VIP in neuroimmunology: a cytokine rather than a neuropeptide? **The FASEB Journal**, v. 18, p. 1325-1334, 2004.

RASSI, A.; RASSI A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrate in chronic chagasic myocardial lesions: presence of TNF $\alpha$  cells and dominance of granzyme AC, CD8C lymphocytes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 637-642, 1993.

RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M.O. Indeterminate form of Chagas' disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31(3), p. 301-314, 1998.

SAID, S.I.; ROSENBERG, R.N. Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neuronal cell lines and normal nervous tissues. **Science**, v. 192, p. 907-908, 1976.

SAID, S. I. Vasoactive intestinal peptide. **Journal of Endocrinological Investigations**, v. 9, p. 191-200, 1986.

SCHERR, M.; EDER, M. Gene silencing by small regulatory RNAs in mammalian cells. **Cell Cycle**, v. 6, p. 444-449, 2007.

SOTGIU, S. et al. Multiple sclerosis and anti-Plasmodium falciparum innate immune response. **Journal of Neuroimmunology**, v. 185, p. 201-207, 2007.

SREEDHARAN, S. P. et al. Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 193, p.e 546, 1995.

STERNBERG, E. M. Neural-immune interaction in health and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2641-2647, 1997.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 6(4), p. 318-328, 2006.

SUNDRUD, M. S. et al. Genetic reprogramming of primary human T cells reveals functional plasticity in Th cell differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 171, p.e 3542, 2003.

SUN, W et al. Altered expression of vasoactive intestinal peptide receptors in T lymphocytes and aberrant Th1 immunity in multiple sclerosis. **International Immunology**, v. 18, p. 1691-1700, 2006.

SZEMA, A.M. et al. Mice lacking the VIP gene show airway hyperresponsiveness and airway inflammation, partially reversible by VIP. **American Journal Physiology Lung Cellular Molecular Physiology**, v. 291, p. 880-886, 2006.

TANOWITZ, H. B. et al. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 51(6), p. 524-539, 2009.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 430-434, 2007.

TEIXEIRA, A.R. et al. Chagas disease. **Postgraduated Medical Journal**, v. 82, p. 788 -798, 2006.

TEIXEIRA, C. G. O. et al. Identificação da hipertrofia cardíaca induzida pelo tratamento de judô. **Revista Científica JOPEF**, v. 11, p. 1-97, 2011.

TOUMI, F. et al. Human submucosal neurons regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. **Neurogastroenterology and motility**, v. 15, p. 239-242, 2003.

TORRES, O.A. Role of the IFNG +874 T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infection*. **Genetics and Evolution**, v.10, p. 682-685, 2010.

VACIC, V. et al. Duplications of the neuropeptide receptor gene VIPR2 confer significant risk for schizophrenia. **Nature**, v. 471, p. 499-504, 2011.

VAGO, A.R. et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **American Journal of Pathology**. 156: 1805-1809. 2000.

ZHAO, H.; PFEIFFER, R.; GAIL, M.H. Haplotype analysis in population genetics and association studies. **Pharmacogenomics**, v. 4, p. 171-178, 2003.

WANG, X. et al. Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, p. 84-90, 2005.

WATKINS LR. et al. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Research*, v. 654(1), p. 15-26, 1994.

WEINSTOCK, J.V. Vasoactive intestinal peptide regulation of granulomatous inflammation in murine *Schistosomiasis mansoni*. **Advances in Neuroimmunology**, v. 6, p. 95-105, 1996.

WHO. Control of chagas disease. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 905, p. 1-120, 2002.



## APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Apresentação de trabalhos

### **- I Simpósio de Integração dos Programas de Pós-Graduação em Biologia Celular da UFMG (2012) – Apresentação de Pôster**

Título: VPAC1 gene polymorphism is associated with the indeterminate form of Chagas Disease.

Autores: Correa, Marielle Valério; Rocha, Manoel Otávio Da Costa; Sousa, Natália Satchiko Hojo De; Ferreira, Karine Silvestre; Gollob, Kenneth John; Menezes, Cristiane Alves Da Silva; Dutra, Walderez Ornelas.

### **- XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology (2011) – Apresentação de pôster**

Título: VPAC1 gene polymorphism is associated with the indeterminate form of Chagas Disease.

Autores: CORREA, M. V.; ROCHA, N. S. H.; SOUZA, N. S. H.; FERREIRA, K. S.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A. S.

