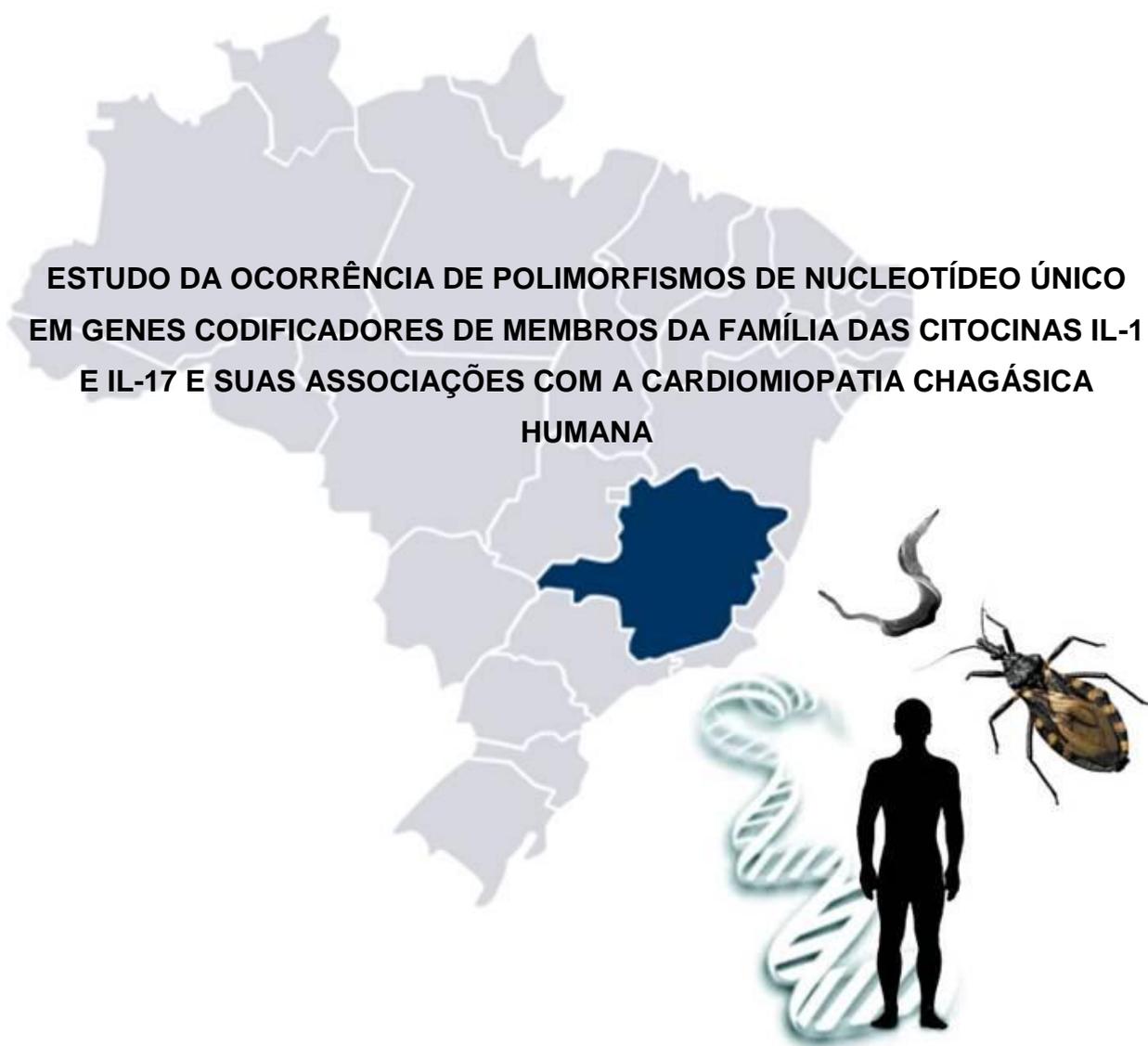


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Natália Satchiko Hojo de Souza

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO
EM GENES CODIFICADORES DE MEMBROS DA FAMÍLIA DAS CITOCINAS IL-1
E IL-17 E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA
HUMANA**



Belo Horizonte
2012

Natália Satchiko Hojo de Souza

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO
EM GENES CODIFICADORES DE MEMBROS DA FAMÍLIA DAS CITOCINAS IL-1
E IL-17 E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA
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. Jeane de Fátima Correia Silva

Belo Horizonte
2012

Hojo-Souza, Natália Satchiko

Estudo da ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único em genes codificadores de membros da família das citocinas IL-1 e IL-17 e suas associações com a cardiomiopatia chagásica humana. [manuscrito] / Natália Satchiko Hojo de Souza. – 2012.

76 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Walderez Ornelas Dutra. Co-orientadora: Jeane de Fátima Correia Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia.

1. Chagas, Doença de. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Citocinas. 4. Interleucina-1. 5. Interleucina-17. 6. Imunogenética. I. Dutra, Walderez Ornelas. II. Silva, Jeane de Fátima Correia. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Morfologia. IV. Título.

CDU: 576.3

Colaboradores:

Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina – UFMG

Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina – UFMG

Dr. Germano Carneiro Costa
Universidade Federal de Viçosa

Dr. Kenneth John Gollob
Santa Casa de Misericórdia – BH
SRI International – CA, EUA

Dr. Antônio Lúcio Teixeira Junior
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina – UFMG



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

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

NATÁLIA SATCHIKO HOJO DE SOUZA

215/2012/07
entrada
1º/2010
2010669910

Às **treze horas e trinta minutos** do dia **28 de fevereiro de 2012** reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO EM GENES CODIFICADORES DE MEMBROS DA FAMÍLIA DAS CITOCINÁS IL-1 E IL-17 E SUAS ASSOCIAÇÕES COM A CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA 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 do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Walderez Ornelas Dutra	UFMG	<i>Aprovada</i>
Dra. Jeane Correia Silva	UFMG	<i>Aprovada</i>
Dr. Ricardo Fujiwara	UFMG	<i>APROVADA</i>
Dra. Annamaria Ravara Vago	UFMG	<i>aprovada</i>

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, 28 de fevereiro de 2012.**

Dra. Walderez Ornelas Dutra *[assinatura]*
(orientadora)
Dra. Jeane Correia Silva *[assinatura]*
(co-orientadora)
Dr. Ricardo Fujiwara *[assinatura]*
Dra. Annamaria Ravara Vago *[assinatura]*

[assinatura]
Profa. Denise Carmona Cara Machado
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular, ICB/UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

A ideia de que existe simplicidade no complexo e complexidade no simples é quase sempre prazerosamente convidativa na reflexão sobre o que quer que seja. (...) Parece, de fato, haver uma simplicidade no complexo. Mas, ao mesmo tempo, uma enorme complexidade em tudo que se apresenta como simples. (Capozzoli, 2012)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra, pela oportunidade, orientações e ensinamentos.

À Dra. Jeane de Fátima Correia Silva pelos ensinamentos e auxílio na execução dos experimentos.

Aos meus pais, Edina e Mauro, pelo incentivo, apoio e dedicação durante todo o meu mestrado.

À minha irmã Fernanda pelo apoio e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia das Interações Celulares pela amizade e companheirismo durante esses dois anos.

À minha amiga, Luiza Cenizio Barbieri, que iniciou junto comigo este desafio.

À Cris, Carol, Luísa e Léo pelas conversas, conselhos, apoio e amizade.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular pela amizade.

À Sibeles pela amizade, apoio e disponibilidade.

Aos pacientes que disponibilizaram amostras para a execução dos experimentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa ao longo deste período.

RESUMO

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e caracteriza-se por uma fase aguda, seguida de uma fase crônica. Na fase crônica, a maioria dos pacientes não apresenta sinais clínicos da doença, sendo classificados como indeterminados. Entretanto, cerca de 20-30% desenvolvem a forma sintomática da doença (cardíaca e/ou digestiva), sendo a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) a forma mais grave da doença de Chagas. A ampla variação no quadro clínico de pacientes chagásicos permite hipotetizar que fatores genéticos relacionados ao hospedeiro, em especial os polimorfismos genéticos, possam ser responsáveis, em parte, pelas diferenças interindividuais de resposta à infecção pelo patógeno. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar possíveis associações entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de genes codificadores das interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-17A e IL-17F e a suscetibilidade ao desenvolvimento de CCC em pacientes brasileiros provenientes do estado de Minas Gerais. As genotipagens dos polimorfismos *IL1A* (-889C/T), *IL1B* (+3954C/T), *IL1RN* (+2018T/C), *IL17A* (-197A/G) e *IL17F* (+7488T/C) foram realizadas em uma amostra de 109 pacientes com CCC e 59 indeterminados, usando a técnica de PCR em tempo real. Os níveis plasmáticos da citocina IL-1 β foram obtidos de 20 pacientes por meio de reações de ELISA. Pacientes portadores da variante alélica T para IL-1 α e IL-1 β possuem duas vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca quando comparados com a forma indeterminada (IL-1 α : OR=2,01; IC=1,06-3,82; p=0,032; IL-1 β : OR=2,53; IC=1,18-5,42; p=0,015). O mesmo foi observado quando se comparou a frequência da variante alélica T (IL-1 α : OR=1,67; IC=1,01-2,77; p=0,043; IL-1 β : OR=2,16; IC=1,11-4,19; p=0,020). Por outro lado, a ocorrência do genótipo heterozigoto (TC) da IL-1ra (antagonista de receptor da IL-1) apresentou associação com a forma clínica indeterminada (OR=2,27; IC=1,02-5,04; p=0,042). As análises multivariadas no *cluster* da IL-1 demonstraram que pacientes com perfil mais pró-inflamatório (portadores das variantes T para IL-1 α e IL-1 β) possuem ainda maior chance de desenvolver a CCC (OR=3,14; IC=1,35-7,32; p=0,008). Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis plasmáticos da IL-1 β entre os grupos de pacientes indeterminado e cardíaco dilatado. Em relação aos polimorfismos nos

genes que codificam para IL-17, o estudo da IL-17A revelou que os portadores do genótipo A- (GG) possuem duas vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca quando comparados com a indeterminada (OR=2,08; IC=1,08-4,00; p=0,027). Resultado similar foi observado em relação à frequência alélica (OR=1,71; IC=1,00-2,91; p=0,048). Em relação ao polimorfismo da IL-17F, não foi encontrada nenhuma associação com as diferentes formas da doença de Chagas na população estudada. Os resultados indicam que polimorfismos em genes da família IL-1 e da IL-17A estão associados com diferentes cursos clínicos da doença de Chagas.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Polimorfismo. Citocinas. IL-1. IL-17.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is characterized by an acute phase followed by a chronic phase. Most patients in the chronic phase do not present any clinical signs being clinically classified as indeterminate. On the other hand, about 30% of the patients develop the symptomatic clinical forms (cardiac and/or digestive), and the chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) is the most severe form of Chagas disease. The wide variation in clinical presentation of chagasic patients allow us to hypothesize that genetic factors related to the host, particularly genetic polymorphisms, may be responsible, at least in part, by the interindividual differences in the response to the infection. Thus, the present study aimed to assess possible associations between single nucleotide polymorphisms of genes encoding the IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-17A and IL-17F and the susceptibility to the development of CCC in Brazilian patients from Minas Gerais. The genotyping of *IL1A* (-889C/T), *IL1B* (+3954C/T), *IL1RN* (+2018T/C), *IL17A* (-197A/G) e *IL17F* (+7488T/C) polymorphisms was performed in a sample of 109 patients with CCC and 59 with the indeterminate form, using Real Time PCR. The plasmatic levels of IL-1 β were obtained from 20 patients using ELISA reaction. Patients carrying the T variant for IL-1 α e IL-1 β have two times more chance of developing the cardiac form as compared to the indeterminate form (IL-1 α :OR=2,01; CI=1,06-3,82; p=0,032; IL-1 β :OR=2,53; CI=1,18-5,42; p=0,015). The same was observed when we analyzed the allelic frequency (IL-1 α :OR=1,67; CI=1,01-2,77; p=0,043; IL-1 β :OR=2,16; CI=1,11-4,19; p=0,020). On the other hand, the heterozygote genotype (TC) of IL-1ra (antagonist receptor of IL-1) was associated with the indeterminate form (OR=2,27; CI=1,02-5,04; p=0,042). Multivariate analysis combining SNPs of IL-1 cluster demonstrated that patients with a more pro-inflammatory profile (carriers of the T variant for both IL-1 α and IL-1 β) have greater chance of developing CCC (OR=3,14; CI=1,35-7,32; p=0,008). No difference was observed in the plasmatic levels of IL-1 β between indeterminate and dilated cardiac patients. The study of IL-17A showed that carriers of the A- genotype (GG) have two times more chance of developing the cardiac form as compared with the indeterminate form (OR=2,08; CI=1,08-4,00; p=0,027). A similar result was observed for the allelic frequency (OR=1,71; CI=1,00-2,91; p=0,048). For the IL-17F polymorphism, no association with different forms of Chagas disease was found in the population under study. In summary, our results

showed that polymorphisms in IL-1 family and IL-17A genes are associated with different clinical outcomes of Chagas disease.

Keywords: Chagas disease. Polymorphism. Cytokines. IL-1. IL-17.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráficos representativos das PCRs em tempo real para a análise de polimorfismos _____	39
Figura 2 – Gráficos representativos da análise multivariada _____	48
Figura 3 - IL-1 β plasmática em amostras de pacientes chagásicos _____	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização demográfica da população de estudo _____	35
Tabela 2 – Identificação dos polimorfismos estudados _____	38
Tabela 3 – Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real _____	38
Tabela 4 – Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> para os polimorfismos gênicos da IL-1 __	42
Tabela 5 – Frequências genotípicas e dos alelos para <i>IL 1A</i> (-889 C/T)_____	43
Tabela 6 – Frequências genotípicas e dos alelos para <i>IL 1B</i> (+3954 C/T) _____	44
Tabela 7 – Frequências genotípicas e dos alelos para <i>IL 1RN</i> (+2018 T/C)_____	45
Tabela 8 – Análise multivariada dos polimorfismos <i>IL 1A</i> (-889 C/T), <i>IL 1B</i> (+3954 C/T) e <i>IL 1RN</i> (+2018 T/C) _____	46
Tabela 9 – Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> para os polimorfismos gênicos da IL-17 _	50
Tabela 10 – Frequências genotípicas e dos alelos para <i>IL 17A</i> (-197 A/G) _____	50
Tabela 11 – Frequências genotípicas e dos alelos para <i>IL 17F</i> (+7488 T/C) _____	52

LISTA DE SIGLAS

A – adenosina
A- – ausência do alelo A
A/G – troca de adenosina por guanina
A+ – presença do alelo A
ACE – enzima conversora de angiotensina
BAT-1 – helicase de RNA dependente de ATP
C – citosina
C/T – troca de citosina por timina
CAM – molécula de adesão celular
CCC – cardiopatia chagásica crônica
CCL2 – ligante-2 de quimiocina
CCR5 – receptor-5 de quimiocina
CD – cardíaco dilatado
CD4+ – cluster de diferenciação 4
CMSP – células mononucleares do sangue periférico
CND – cardíaco não dilatado
DC – célula dendrítica
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTP – desoxinucleotídeos trifosfato
G- – ausência do alelo G
G – guanina
G+ – presença do alelo G
IFN- γ – interferon gama
IKBLNFKBIL1 – proteínas reguladoras da família NF κ B
IL – interleucina
IL10 – gene da interleucina 10
IL-10 – interleucina 10
IL-12 – interleucina 12
IL17A – gene da interleucina 17A
IL-17A – interleucina 17A
IL17F – gene da interleucina 17F
IL-17F – interleucina 17F
IL1A – gene da interleucina 1 alfa
IL1B – gene da interleucina 1 beta
IL-1ra – interleucina 1 ra
IL1RN – gene da interleucina 1 ra
IL-1 α – interleucina 1 alfa
IL-1 β – interleucina 1 beta
IL-21 – interleucina 21
IL-22 – interleucina 22

IL-23 – interleucina 23
IL-4 – interleucina 4
IL-6 – interleucina 6
IND – indeterminado
LTA – linfotoxina- α
MAL/TIRAP – proteína adaptadora
MCP-1 – proteína-1 quimioatraente de monócitos
MHC – complexo de histocompatibilidade principal
MIF – fator inibitório de migração de macrófagos
ng – nanograma
NK – célula *natural killer*
NKT – célula T *natural killer*
NO – óxido nítrico
NOS2 – sintase de óxido nítrico
NRAMP-1 – proteína-1 de macrófago associado a resistência natural
OR – *Odds Ratio*
PCR (*polymerase chain reaction*) – reação em cadeia da polimerase
PGE-2 – prostaglandina E2
rpm – rotação por minuto
SNP (*single nucleotide polymorphism*) – polimorfismo de nucleotídeo único
T- – ausência do alelo T
T – timina
T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*
T/C – troca de timina por citosina
T+ – presença do alelo T
TGF- β – fator de crescimento tumoral beta
Th1 – subpopulação de células T CD4+ auxiliares 1
Th17 – subpopulação de células T CD4+ auxiliares 17
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
TNF- β – fator de necrose tumoral beta
 χ^2 – qui-quadrado
 μL – microlitro
95%IC – intervalo de confiança de 95%

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 A doença de Chagas	18
1.2 Cardiomiopatia Chagásica Crônica	19
1.3 Polimorfismos genéticos e seus possíveis envolvimento na Cardiomiopatia Chagásica Crônica	21
1.4 Interleucinas IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra	24
1.5 Interleucinas IL-17A e IL-17F	28
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 População de estudo	35
4.2 Obtenção das amostras de DNA	35
4.3 Extração do DNA	36
4.4 Determinação da concentração de DNA das amostras	37
4.5 Avaliação dos polimorfismos genéticos	37
4.6 Quantificação da IL-1 β plasmática	39
4.7 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Cluster da interleucina-1	42
5.1.1 Interleucina-1alfa (IL-1 α)	42
5.1.2 Interleucina-1beta (IL-1 β)	43
5.1.3 Interleucina-1ra (IL-1ra)	45
5.1.4 Análise multivariada – regressão logística binária	46
5.1.5 Avaliação da formação de haplótipos e análise de desequilíbrio de ligação	48
5.1.6 IL-1 β plasmática em amostras de pacientes chagásicos	49
5.2 Interleucina-17	50
5.2.1 Interleucina-17A (IL-17A)	50
5.2.2 Interleucina-17F (IL-17F)	51
5.3 Adequação do tamanho da amostra	52

6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE	75



1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas é uma patologia causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* que, apesar dos múltiplos esforços empreendidos pelos vários setores da sociedade (governo, comunidade científica, agências regulamentadoras) objetivando o controle e possível erradicação da doença, ainda acomete uma parcela significativa da população, especialmente em países da América Latina onde a doença se apresenta de forma endêmica.

Entretanto, a doença de Chagas não se restringe às áreas endêmicas da América do Sul e Central. O crescente fluxo migratório de pessoas dessas áreas para países não endêmicos tais como, EUA, Canadá, Espanha, França e Suíça, têm aumentado o número de casos diagnosticados, cujo risco de transmissão se deve à transfusão sanguínea com sangue de doadores infectados por *T. cruzi* (LESCURE et al., 2010).

Embora se tenha verificado uma notável redução de casos de infecção humana entre 1996-2006, as estatísticas revelaram a ocorrência de cerca de 15 milhões de casos (DIAS, 2009). Atualmente, estima-se que 12 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* o agente causador da doença de Chagas (DIAS, 2009). Além disso, nos últimos anos, novos casos de doença aguda vêm sendo descritos no Brasil (STEINDEL et al., 2008).

Apesar dos avanços nos conhecimentos sobre a doença de Chagas desde sua identificação em 1909, a complexa interação parasito-hospedeiro não permitiu ainda a implementação de medidas totalmente eficazes (detecção precoce da doença, novas drogas para tratamento, vacinas) para o combate da doença. Desse modo, medidas preventivas, cujo foco é o vetor (triatomíneo), são os métodos mais efetivos e bastante recomendados.

Ao longo de um século de estudos e pesquisas, foi possível verificar que a compreensão da doença de Chagas exige abordagem complexa, tendo em vista os aspectos multifatoriais (ambiente-parasito-vetor-hospedeiro) que propiciam a infecção e definem o curso da doença.

Do ponto de vista ambiental, os desmatamentos e destruição dos ecossistemas, bem como a ocupação desordenada do ambiente pelo homem, têm aumentado a

possibilidade de contato com os triatomíneos, vetores da doença (CARDOSO et al., 2009).

Em relação ao vetor, o uso crescente de inseticidas para seu controle tem provocado o aumento do número de insetos resistentes (pressão de seleção) (CARDOSO et al., 2009). Por outro lado, do ponto de vista do hospedeiro humano, vários fatores tais como condições socioeconômicas desfavoráveis e baixo investimento em educação (educação ambiental, educação em saúde, capacitação de profissionais para atendimento da população), concorrem para o não-equacionamento de um problema considerado de saúde pública, colocando a doença de Chagas na categoria de “doenças negligenciadas”.

Neste cenário, onde fatores extrínsecos se entrelaçam, favorecendo a ocorrência de infecção e desenvolvimento da doença de Chagas, muitos esforços também têm sido direcionados para melhorar a compreensão da interação entre o parasito e o organismo infectado, de forma a auxiliar no tratamento e buscar uma possível cura de pacientes acometidos pela doença.

A doença de Chagas é caracterizada por duas fases: uma fase aguda, que dura de 2-4 meses após a infecção, e uma fase crônica que pode durar anos ou décadas. Nesta fase, do ponto de vista clínico, a grande maioria dos pacientes apresenta-se sem sinais clínicos da doença, sendo denominados de indeterminados (IND). Porém, cerca de 30% dos indivíduos infectados evoluem para formas clínicas crônicas sintomáticas da doença: digestiva (megacólon e/ou megaesôfago) e/ou cardíaca (cardiomiopatia chagásica crônica) (DUTRA; GOLLOB, 2008; DUTRA et al., 2009).

Ainda não são conhecidas as razões pelas quais a doença de Chagas progride num determinado grupo de indivíduos infectados pelo *T.cruzi*, para diferentes formas clínicas da doença. Acredita-se que fatores tais como a linhagem do parasito, tropismo tecidual, carga parasitária, tempo de infecção, natureza da resposta imune e o *background* genético do hospedeiro (homem) influenciariam na evolução clínica da doença (DUTRA; GOLLOB, 2008).

1.2 Cardiomiopatia Chagásica Crônica

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é a manifestação mais séria da doença de Chagas e pode se apresentar dentro de um espectro variado de formas

clínicas decorrente da existência, concomitante ou não, de arritmia cardíaca, insuficiência cardíaca e tromboembolismo (sistêmico e pulmonar) (RASSI JR. et al., 2009).

Vários estudos apontam que a CCC resulta principalmente da potente resposta imune do hospedeiro contra o agente infeccioso e, possivelmente, também pelo desenvolvimento de autorreatividade (DUTRA et al., 2009; DUTRA; GOLLOB, 2008, CUNHA-NETO et al., 2009).

Os mecanismos envolvidos na patogênese da doença de Chagas cardíaca incluem alterações estruturais e funcionais, tais como: necrose de cardiomiócitos, injúrias microvasculares, isquemia do miocárdio, desregulação da autorritimicidade cardíaca, fibrose e hipertrofia cardíaca, além de autorreatividade tecidual. Todas essas alterações contribuem para a ocorrência de arritmias cardíacas, tromboembolismo e insuficiência cardíaca, podendo levar a morte súbita. As principais causas de morte de pacientes chagásicos cardíacos são: fibrilação ventricular (55-65%), insuficiência cardíaca congestiva (25-30%) e embolia cerebral ou pulmonar (10-15%) (RASSI JR. et al., 2009).

A busca por indicadores de prognóstico baseados em características fisiopatológicas clínicas permitiram o delineamento de um modelo de estratificação de risco ao desenvolvimento da CCC. De acordo com este modelo, pacientes de alto risco são aqueles que apresentam insuficiência cardíaca (classe funcional III/IV), disfunção ventricular (cardiomegalia, diminuição da contratilidade ventricular esquerda e/ou aumento do diâmetro ventricular esquerdo) e instabilidade elétrica ventricular (taquicardia ventricular não-sustentada sob monitoramento Holter 24h). Por outro lado, pacientes de baixo risco são aqueles que apresentam ECG anormal, porém pertencem à classe funcional I/II, não apresentam cardiomegalia, disfunção ventricular, nem mesmo instabilidade elétrica ventricular. E, finalmente, pacientes de risco intermediário são aqueles que se situam entre esses dois extremos, apresentando ou cardiomegalia, ou disfunção ventricular, associada à instabilidade elétrica ventricular. Uma vez estimado o grau de risco, tais pacientes poderiam receber tratamentos diferenciados, bem como acompanhamento mais adequado conforme a situação (RASSI JR. et al., 2009). Deve-se mencionar que, em relação aos critérios clínicos, nem sempre há possibilidade de aplicação dos exames aos pacientes dada a não disponibilidade de tecnologias em muitas regiões remotas e pobres, onde geralmente concentram-se os pacientes.

Do ponto de vista histopatológico, pacientes com CCC apresentam miocardite difusa, embora com aspectos focais, cujo infiltrado é composto de macrófagos, linfócitos B e T (com predominância de células T CD8+ sobre as CD4+, na proporção de 2:1), além de outros tipos celulares como eosinófilos e neutrófilos (CUNHA-NETO et al., 2009; RASSI JR. et al., 2009). Atualmente, acredita-se que uma combinação entre a reatividade anti-parasito e anti-componentes do hospedeiro seja responsável pela destruição tecidual observada nos pacientes chagásicos cardíacos.

Possivelmente, um desequilíbrio nos mecanismos imunorregulatórios, com prevalência da resposta inflamatória devido à falha de mecanismos reguladores, seja o principal fator que determina a evolução da doença de Chagas para a CCC. Nesse sentido, alguns estudos sugerem que o balanço entre as citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , e imunomodulatórias, como a IL-10, determinariam o destino da infecção e progressão da doença (GOMES et al., 2005; VITELLI- AVELAR et al; 2008; DUTRA; GOLLOB, 2008; DUTRA et al., 2009).

A ampla variação no quadro clínico e na resposta imunológica de pacientes acometidos pela doença de Chagas permite hipotetizar que fatores genéticos relacionados ao hospedeiro, em especial os polimorfismos de genes codificadores de citocinas, quimiocinas e outras moléculas envolvidas no processo inflamatório do tecido cardíaco, possam ser responsáveis, em parte, pelas diferenças interindividuais de resposta à infecção e indicarem marcadores de suscetibilidade, auxiliando no prognóstico, prevenção ou tratamento mais efetivo da doença (FERNÁNDEZ-MESTRE, 2002; DUTRA et al., 2009; CUNHA-NETO et al., 2009).

1.3 Polimorfismos genéticos e seus possíveis envolvimento na Cardiomiopatia Chagásica Crônica

Polimorfismo genético é a denominação dada 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). Os mais comuns incluem segmentos repetidos *in tandem* (nucleotídeos de mini e microsátélites), deleções/inserções/duplicações de segmentos pequenos ou grandes (variantes do número de cópias) e polimorfismos de nucleotídeo único (CHORLEY et al., 2008).

Polimorfismos de nucleotídeo único (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). A base de dados de SNPs do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) lista mais de 11 milhões de SNPs identificados na população humana, sendo que a maioria dos polimorfismos comuns tem pequeno impacto sobre a saúde humana. Porém, recentes evidências mostram que determinadas variantes podem influenciar na suscetibilidade a doenças (CHORLEY et al., 2008). Dessa forma, nos últimos anos, pesquisas envolvendo SNPs funcionais têm mostrado associação entre a ocorrência de SNPs e suscetibilidade a diversas doenças, incluindo-se as doenças infecciosas, autoimunes e inflamatórias (inflamação crônica) (DUTRA et al., 2009; KUBISTOVA et al., 2009; GREGERSEN; OLSSON, 2009).

Tendo em vista que a fase crônica da doença de Chagas é fisiopatologicamente variável e possivelmente conta com a participação de fatores genéticos do paciente, na atualidade, pesquisas estão sendo direcionadas para a caracterização da predisposição genética do hospedeiro e identificação de marcadores de suscetibilidade para o desenvolvimento de formas crônicas da doença.

Nesse sentido, estudos de polimorfismos genéticos associados à predisposição ou resistência ao desenvolvimento de CCC em pacientes infectados pelo *T. cruzi* têm sido realizados. Partindo do pressuposto de que a progressão da doença é multifatorial e depende da interação entre aspectos relacionados ao hospedeiro e aqueles expressos pelo parasito (heterogeneidade genética), a caracterização da predisposição genética do hospedeiro poderá auxiliar na identificação de fatores de risco.

Visto que o processo inflamatório exerce um importante papel na patogênese da CCC, os polimorfismos de genes codificadores de moléculas envolvidas na resposta imune/inflamatória (citocinas, quimiocinas, proteínas do MHC, etc.) vêm recebendo atenção crescente.

Estudos de associação de polimorfismos em genes codificadores de proteínas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) com a doença de Chagas foram realizados em diversas populações (brasileira, venezuelana, peruana, argentina e mexicana) e os resultados mostraram-se contraditórios, possivelmente devido a variabilidade étnica (DEGHAIDE et al., 1998; FAÉ et al., 2000; FERNANDEZ-

MESTRE et al., 1998; COLORADO et al., 2000; LAYRISSE et al., 2000; NIETO et al., 2000; CRUZ-ROBLES et al., 2004; GARCÍA-BORRÁS et al., 2009).

Resultados contraditórios também foram observados em relação ao polimorfismo *TNFA* (BERAÚN et al., 1998; DRIGO et al. 2007; PISSETTI et al., 2011; RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2005; CRIADO et al., 2012) e *TNFB*, também conhecido como LTA (linfotoxina- α), (BERAÚN et al., 1998; RAMASAWMY et al., 2007).

Em relação aos polimorfismos em genes codificadores de receptores *toll-like*, não foram observadas associações com a suscetibilidade a doença de Chagas cardíaca (ZAFRA et al., 2008; RAMASAWMY et al., 2009), porém foi verificada associação do polimorfismo do gene codificador da MAL/TIRAP (sinalizadora intracelular de receptores *toll-like*) com proteção ao desenvolvimento de CCC (RAMASAWMY et al., 2009).

Polimorfismos em genes codificadores da CCL2/MCP-1 (RAMASAWMY et al. 2006a), BAT-1 (RAMASAWMY et al. 2006b), CCR5 (CALZADA et al., 2001a; FERNANDEZ-MESTRE et al., 2004) e IKBL/NFKBIL1 (RAMASAWMY et al., 2008) mostraram associação com a CCC. Por outro lado, polimorfismos em genes codificadores de MIF (TORRES et al., 2009), TGF- β 1 (CALZADA et al., 2009), IFN- γ (TORRES et al., 2010a) mostraram associação com a suscetibilidade a doença de Chagas.

Polimorfismos de nucleotídeo único em genes codificadores de interleucinas, tais como *IL1B* (FLÓREZ et al., 2006), *IL1RN* (CRUZ-ROBLES et al., 2009), *IL-12* (ZAFRA et al., 2007) mostraram associação com a doença de Chagas cardíaca. Em relação a IL-10, os resultados são contraditórios. Enquanto Costa e colaboradores (2009) verificaram associação do genótipo AA e do alelo A com cardiomiopatia chagásica em pacientes brasileiros, Flórez e colaboradores (2011) não observaram associação do mesmo polimorfismo, IL-10 (-1082 G/A), em pacientes colombianos.

Em relação aos polimorfismos nos genes da ACE (PASCUIZZO-LIMA et al., 2009), NOS2 (CALZADA et al., 2002), NRAMP-1 (CALZADA et al., 2001b) e IL-6 (TORRES et al., 2010b) não houve associação com a doença de Chagas.

Em síntese, os estudos de polimorfismos genéticos na doença de Chagas têm recebido grande atenção pela comunidade científica, porém, os resultados são muitas vezes contraditórios, justificando a necessidade de realização de estudos nas diferentes populações.

A busca por marcadores imunológicos que possam indicar resistência/suscetibilidade ao desenvolvimento de CCC estabelece uma nova forma de abordagem da doença de Chagas, abrindo perspectivas de tratamentos complementares com drogas imunomodulatórias e acompanhamento de pacientes com base em marcadores imunológicos (LESCURE et al., 2010).

Os tópicos subsequentes focalizam-se nas citocinas que fazem parte de nosso estudo: as citocinas da família IL-1 e IL-17.

1.4 Interleucinas IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra

A família da Interleucina-1 (IL-1) é constituída de 11 membros (IL-1F1 a IL-1F11, nova nomenclatura), sendo as mais estudadas a IL-1 α (IL-1F1), IL-1 β (IL-1F2), IL-1ra (IL-1F3) e IL-18 (IL-1F4). Com exceção da IL-18 e IL-33 (IL-1F11), os genes codificadores da família da IL-1 localizam-se no braço longo do cromossomo 2 humano (DINARELLO, 2009). Cabe ressaltar que, apesar da nova nomenclatura adotada com a identificação de novos membros da família IL-1, a IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra ainda são assim referidas.

A principal função das citocinas tipo IL-1 é participar de reações pró-inflamatórias em resposta a injúrias teciduais desencadeadas por PAMPS (padrões moleculares associados à patógenos), tais como produtos bacterianos ou virais, e por DAMPS (padrões moleculares associados a dano tecidual), liberados pelo tecido danificado, tais como cristais de ácido úrico e 5'ATP (WEBER et al., 2010).

A família da IL-1 é variada e comporta membros com propriedades inflamatórias, como a IL-1 α e IL-1 β ; e também citocinas supressoras da inflamação, como é o caso da IL-1ra (antagonista de receptor da IL-1). A IL-1ra é uma molécula estruturalmente relacionada a IL-1 α e IL-1 β , que se liga avidamente ao receptor da IL-1 tipo1 (IL-1RI) e neutraliza a atividade da IL-1 α e IL-1 β , suprimindo desse modo a inflamação (DINARELLO, 2009).

A IL-1 α e IL-1 β são citocinas que são produzidas em diversas condições inflamatórias, tais como infecções, artrite reumatóide, doenças inflamatórias gastrointestinais e patologias cardiovasculares (AREND, 2002; BUJAK; FRANGOIANNIS, 2009).

Existem dois tipos de receptores primários aos quais a IL-1 α e IL-1 β se ligam. O receptor tipo I (IL-1RI), responsável pela mediação das ações da IL-1 (α e β), e o receptor tipo II (IL-1RII) que não traduz o sinal, constituindo-se em receptor inerte (receptor *decoy*). O receptor IL-1RII além de ligado à membrana celular, também existe em sua forma solúvel (ARENDA, 2002).

A IL-1 (α e β) são produzidas principalmente por monócitos e macrófagos (WEBER et al., 2010), embora também sejam produzidas por outros tipos celulares como células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, neutrófilos, linfócitos, células dendríticas, hepatócitos e células musculares. As principais células-alvo dessas citocinas são células imunes como macrófagos, linfócitos, granulócitos e células dendríticas (VICENOVÁ et al., 2009).

A IL-1 α é encontrada no interior das células na forma de molécula precursora ativa. Geralmente não é encontrada na circulação ou fluidos corporais, mas pode ser liberada de células necróticas. Além disso, a IL-1 α pode ser encontrada ancorada na superfície de várias células, particularmente em monócitos e linfócitos B, sendo referida como IL-1 α de membrana (DINARELLO, 2009). A IL-1 α de membrana é biologicamente ativa e sinaliza por meio de mecanismos parácrinos, exercendo importante papel nos processos inflamatórios, pois é estimuladora crítica da atividade do IFN- γ (DINARELLO, 2009).

A IL-1 β é produzida primariamente por monócitos, macrófagos teciduais e células dendríticas, podendo ser produzida também por linfócitos B e células NK. Diferentemente da IL-1 α , que é encontrada na célula na forma ativa, a IL-1 β é sintetizada na forma de precursora inativa, sendo ativada pela caspase-1 e secretada por via não convencional de proteína e atuando de forma parácrina ou sistêmica (WEBER et al., 2010).

A participação da IL-1 β na doença de Chagas pode ser hipotetizada a partir de alguns relatos existentes na literatura, utilizando-se modelos experimentais. Estudos já sugeriram o envolvimento da IL-1 β na hipertrofia de cardiomiócitos mediada por sinalização via TLR2. Experimentos *in vitro* revelaram que esta citocina é o mediador primário da hipertrofia de cardiomiócitos induzida pela infecção com *T. cruzi*. Esse resultado mostrou um importante papel da IL-1 β sobre a função cardíaca durante infecção aguda por *T. cruzi*, sugerindo, dessa forma, que a hipertrofia cardíaca não ocorre somente na fase crônica da doença de Chagas (PETERSEN; BURLEIGH,

2003; PETERSEN et al., 2005). Apoiando esta hipótese, já foi demonstrada a ocorrência de cardiopatia em vários pacientes na fase aguda da doença (ROCHA et al., 2007; HIGUCHI et al., 2003), embora associações entre a expressão de IL-1 ou outras citocinas e a cardiopatia aguda não tenha ainda sido estudada.

A IL-1 β é capaz de aumentar a expressão de moléculas de adesão celular (CAM) que, juntamente com quimiocinas, promovem a infiltração de células inflamatórias imunocompetentes para o tecido alvo, resultando em inflamação crônica (DINARELLO, 2009). Considerando-se que a migração de células inflamatórias para o tecido cardíaco depende de CAM, que contribuem para miocardite e imunidade protetora, mas que também pode induzir inflamação crônica prejudicial, é possível que estas moléculas estejam envolvidas no desenvolvimento da CCC. Estudos relacionados com o envolvimento de CAM na infecção experimental com *T. cruzi* mostraram que camundongos infectados apresentam expressão aumentada de molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1). O aumento de ICAM-1 pode ser modulado pelo IFN- γ ou outros fatores inflamatórios durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* (LANNES-VIEIRA et al., 2009). Em humanos, um aumento da expressão de ICAM-1 no endotélio vascular de tecido cardíaco de pacientes portadores de CCC já foi demonstrado (REIS et al., 1993; HIGUCHI et al., 1993).

A IL-1ra é um antagonista do receptor da IL-1 que ocorre naturalmente, sendo produzida pelas mesmas células que sintetizam IL-1 α e IL-1 β . A IL-1ra apresenta três isoformas intracelulares e uma isoforma que é secretada (sIL-1ra). Esta isoforma que é secretada se liga ao receptor IL-1RI e inibe competitivamente as respostas mediadas pela IL-1 α e IL-1 β atuando, portanto, como uma citocina anti-inflamatória (AREND, 2002).

Ao contrário de outras citocinas que afetam diretamente a função, diferenciação e expansão de linfócitos, muitos membros da família IL-1 atuam indiretamente sobre as respostas imunes. Por exemplo, a IL-1 β leva à produção aumentada de PGE₂, fator de ativação plaquetária e NO, pela indução da expressão gênica da síntese da cicloxigenase tipo 2, fosfolipase tipo 2 e a sintase de óxido nítrico induzível, respectivamente.

A participação de citocinas IL-1 em doenças cardiovasculares é bastante estudada. Pesquisas têm mostrado que a IL-1 (α e/ou β) aumenta a apoptose de

cardiomiócitos em isquemia do miocárdio, aumenta a resposta inflamatória e fibrose cardíaca pós-infarto, promove o remodelamento cardíaco da matriz extracelular pelo aumento da expressão de metaloproteinases de matriz pelos fibroblastos cardíacos. Além disso, a IL-1 (α e β) exerce importante papel na aterosclerose coronariana pela modulação do metabolismo do colesterol, formação de lesões ateromatosas, aumento da inflamação vascular e pela promoção de ruptura de ateromas. A IL-1 β produzida por células endoteliais e macrófagos intersticiais também promove hipertrofia cardíaca em situações de estenose aórtica e insuficiência cardíaca congestiva (BUJAK; FRANGOIANNIS, 2009).

Em resumo, a IL-1 α e IL-1 β induzem a rápida expressão gênica em diferentes tipos celulares, tais como monócitos, macrófagos, células epiteliais e endoteliais, condrócitos e fibroblastos atuando, como citocinas pró-inflamatórias. Contrariamente, a IL-1ra apresenta propriedades anti-inflamatórias por meio da ligação ao receptor da IL-1 α ou IL-1 β , porém sem atividade agonista, bloqueando e atuando como um modulador da resposta inflamatória (DINARELLO, 2009; WEBER et al., 2010).

Em relação a polimorfismos gênicos, vários estudos já demonstraram a associação entre polimorfismos nos genes que codificam para diferentes membros da IL-1 e doenças inflamatórias tais como periodontite, retinocoroidite toxoplásmica e colite ulcerativa (MOREIRA et al. 2005; 2007; KOMATSU et al., 2008; CORDEIRO et al., 2008; CARTER et al., 2001). Na doença de Chagas, estudos de polimorfismos nos genes *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN* foram realizados em pacientes colombianos (FLÓREZ et al., 2006) e mexicanos (CRUZ-ROBLES et al., 2009), entretanto ainda não foram realizados na população brasileira.

No presente estudo foram avaliados os polimorfismos nos genes *IL1A* (-889 C/T), *IL1B* (+3954 C/T) e *IL1RN* (+2018 T/C), que se localizam no braço longo do cromossomo 2. Na literatura existem estudos demonstrando que as variantes alélicas dos três polimorfismos escolhidos têm sido associados à maior produção das citocinas IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra (SMITH; HUMPHRIES, 2009; POCIOT et al., 1992; DANIS et al., 1995; HURME; SANTILLA, 1998; CARTER et al., 2001).

1.5 Interleucinas IL-17A e IL-17F

As células Th17 efetoras participam da resposta imune atuando principalmente contra bactérias extracelulares e fungos. Mas, possivelmente, são também responsáveis pela patogênese de diversas doenças autoimunes, inflamatórias e alérgicas, tais como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, doenças inflamatórias do trato gastrointestinal (doença de Crohn e colite ulcerativa) e asma (ONISHI; GAFFEN, 2010).

A diferenciação desta subpopulação a partir de células T CD4⁺ virgens é induzida pela ação concomitante de TGF- β e IL-6, e possivelmente, IL-1 β . A IL-23 é necessária para a amplificação (células T de memória) e estabilização de fenótipo Th17 das células efetoras, as quais passam a produzir principalmente IL-17, IL-21 e IL-22 (ROMAGNANI, 2008; AWASTHI; KUCHROO, 2009a; ONISHI; GAFFEN, 2010). A IL-17 é a principal citocina produzida e, sua família é composta por seis membros (IL-17A a IL-17F) e, geralmente, a IL-17A é referida apenas como IL-17. Os genes codificadores destas citocinas localizam-se em diferentes cromossomos, com exceção da IL-17A e IL-17F, cujos genes localizam-se no cromossomo 6 em humanos (no cromossomo 1 em camundongos) (AWASTHI; KUCHROO, 2009a).

Cabe destacar, porém, que a IL-17A e IL-17F não são exclusivamente produzidas pelas células Th17. Vários tipos celulares da imunidade inata, tais como macrófagos, células dendríticas (DCs), células Natural Killer (NK), células T Natural Killer (NKT) e células T $\gamma\delta$ também secretam essas citocinas (ONISHI; GAFFEN, 2010). Dessa forma, é mais adequado referir às citocinas IL-17A e IL-17F, de modo geral, sem restringi-las ao tipo celular Th17.

Estudos têm mostrado que a IL-17A e IL-17F ativam células teciduais a produzirem citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-1 β) e quimiocinas, auxiliam na infiltração de neutrófilos e agravam a injúria tecidual pela indução da produção de NO e metaloproteinases de matriz (AWASTHI; KUCHROO, 2009a; DAMSKER et al., 2010; ROMAGNANI, 2008).

Por muito tempo, a inflamação em doenças autoimunes foi atribuída às células Th1, como mediadoras do processo. No entanto, hoje, o papel das células Th17 tem recebido atenção crescente, visto que a expressão da IL-17 está aumentada no sítio da inflamação em doenças como artrite reumatóide, uveíte, psoríase e esclerose múltipla. Porém, ainda se especula sobre porque em alguns modelos experimentais de doença autoimune, a patologia é dirigida pelas células Th17 e, em outros, pelas

células Th1. Há evidências crescentes demonstrando que dependendo da patologia e do tecido-alvo envolvido no processo inflamatório, as células Th1 e Th17 podem funcionar como antagônicas ou como colaboradoras (DAMSKER et al., 2010).

Em relação à possível participação da IL-17 na doença de Chagas, os relatos existentes na literatura ainda são extremamente escassos e se referem a estudos de infecção aguda com *T. cruzi* em animal experimental. Camundongos deficientes em IL-17 (IL-17^{-/-}) infectados com *T. cruzi* apresentaram parasitemia mais elevada, maior taxa de mortalidade em comparação com camundongos C57BL/6 (tipo selvagem) e expressão mais baixa de IFN γ , IL-6 e TNF α , sugerindo um importante papel da IL-17 na resolução da infecção por *T. cruzi* (MIYAZAKI et al., 2010). Por outro lado, Guedes e colaboradores (2010), atribuem um papel anti-inflamatório para a IL-17 em estudo realizado com camundongos BALB/C infectados por *T. cruzi*, em função da redução da expressão da IL-12, diminuição da produção de IFN γ , TNF α e quimiocinas envolvidas na resposta tipo Th1.

Em relação aos polimorfismos nos genes que codificam a IL-17A e IL-17F estudos têm investigado o papel dos polimorfismos em doenças inflamatórias como colite ulcerativa e doença inflamatória intestinal (ARISAWA et al., 2008; SEIDERER et al., 2008). Em relação à doença de Chagas, ainda não existem relatos na literatura sobre o papel destes polimorfismos.

No presente estudo foram avaliados os polimorfismos funcionais nos genes *IL17A* (-197 A/G) e *IL17F* (+7488 T/C), que se localizam no braço curto do cromossomo 6, na doença de Chagas. Já foi demonstrado que o alelo ancestral (A) do polimorfismo da IL-17A (-197 A/G) está associado à maior produção desta citocina (ESPINOZA et al., 2011). Por outro lado, a variante alélica (C) do polimorfismo da IL-17F (+7488 T/C) tem sido associado à menor produção da citocina (KAWAGUCHI et al., 2006).

Como mencionado, diversos polimorfismos genéticos podem estar envolvidos na suscetibilidade/resistência ao desenvolvimento de CCC em pacientes infectados com *T. cruzi*. Além disso, as citocinas das famílias IL-1 e IL-17 possuem papéis de grande importância na resposta imunológica. Nossa hipótese de estudo é que polimorfismos em genes codificadores de citocinas das famílias de IL-1 e da IL-17 estão associados ao desenvolvimento da CCC em indivíduos brasileiros.



2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é a manifestação mais grave da doença de Chagas. Embora a CCC possa ser atribuída a diferenças na resposta imune do hospedeiro e com possíveis consequências relacionadas ao desenvolvimento de autorreatividade, ainda existem poucas informações sobre as diferenças genéticas individuais que levam a manifestações clínicas variadas da doença.

Polimorfismos em genes codificadores de citocinas das famílias IL-1 e IL-17 são investigados em diversas patologias inflamatórias, pois a presença de determinadas variantes gênicas têm mostrado alterar a expressão dessas citocinas.

Diante da gravidade da cardiomiopatia chagásica crônica, a busca por marcadores de suscetibilidade genética associados à doença mostra-se relevante, na medida em que poderá indicar grupos de risco e permitir intervenção precoce, minimizando ou evitando os prejuízos causados pela doença, que acomete e compromete a vida de muitos indivíduos, principalmente aqueles que vivem em regiões endêmicas e em condições socioeconômicas pouco favoráveis.

Considerando-se que as citocinas da família IL-1 exercem importante papel em doenças cardíacas e o fato de que tanto as citocinas da família IL-1 como da IL-17 participam de mecanismos imunológicos possivelmente associados ao desenvolvimento da CCC, propusemo-nos a investigar a possível influência de polimorfismos em genes codificadores das citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-17A e IL-17F na predisposição ao desenvolvimento da doença de Chagas cardíaca.



3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Geral: Estudar a ocorrência de polimorfismos nos genes *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL17A* e *IL17F* em pacientes portadores de doença de Chagas e estabelecer as possíveis associações com o desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica crônica.

Específicos:

- ❖ Determinar as frequências dos genótipos polimórficos e dos alelos em genes codificadores das citocinas $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-1ra$, $IL-17A$ e $IL-17F$, nas amostras de DNA extraídos de material coletado de pacientes portadores da doença de Chagas crônica, provenientes do estado de Minas Gerais;
- ❖ Comparar as frequências dos polimorfismos genéticos encontrados em pacientes indeterminados com aqueles apresentando diferentes graus clínicos de cardiomiopatia chagásica crônica;
- ❖ Estabelecer a possível associação existente entre os polimorfismos estudados e a suscetibilidade ao desenvolvimento de cardiomiopatia chagásica crônica;
- ❖ Avaliar os níveis plasmáticos da $IL-1\beta$ em pacientes com as formas indeterminada e cardíaca dilatada da doença de Chagas.



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População de estudo

Os pacientes chagásicos participantes deste estudo são provenientes de regiões endêmicas de Minas Gerais e que recebem acompanhamento e tratamento médico no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. O presente trabalho foi realizado com 168 indivíduos soropositivos para *T. cruzi*. Posteriormente, eles foram separados em 3 grupos com base em critérios clínicos e laboratoriais estabelecidos pelo Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha e seu grupo (ROCHA et al., 2007): pacientes chagásicos indeterminados (IND), cardiopatas não dilatados (CND) e cardiopatas dilatados (CD).

As características da população avaliada são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização demográfica da população de estudo

Forma Clínica	Indeterminado n=59	Cardíaco Não Dilatado n=49	Cardíaco Dilatado n=60	Total n=168
Masculino	28 (33,7%)	20 (24,1%)	35 (42,2%)	83
Feminino	31 (36,5%)	29 (34,1%)	25 (29,4%)	85
Faixa etária	18-73	29-67	22-77	
Média ± DP	43,3±10,4	46,3±9,8	51,1±10,4	

Pacientes que apresentavam algum quadro patológico além da doença de Chagas, que pudesse contribuir para o desenvolvimento de cardiopatia, tais como, diabetes mellitus, hipertensão arterial, disfunção tireoidiana, insuficiência renal, doença obstrutiva pulmonar crônica, doenças autoimunes e doenças reumáticas não foram incluídos no estudo.

Todos os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento para a participação. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da UFMG (parecer #006/05).

4.2 Obtenção das amostras de DNA

Células contendo DNA dos pacientes foram obtidas por meio de raspagem bilateral da mucosa oral com o auxílio de uma espátula de plástico. Este raspado foi

transferido para tubos *ependorff* contendo solução de Krebs (KCl 4mM, NaCl 124mM, C₆H₁₂O₆ 10mM, C₈H₁₇N₂NaO₄S 23mM, MgSO₄ 1mM) e armazenado a -20°C para posterior extração do DNA.

4.3 Extração do DNA

O DNA das amostras coletadas foi extraído utilizando-se o método descrito por Boom e colaboradores (1990) - modificado. Este método baseia-se na adesão do DNA à sílica, permitindo sua purificação por precipitação, conforme descrito a seguir.

Os *ependorfs* contendo o raspado da mucosa oral e solução de Krebs foram submetidos à centrifugação a 11.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta e descartado em solução de hipoclorito 1%. Ao *pellet* foi adicionado 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). Os *pellets* foram ressuspensos utilizando-se o vórtex e incubados a 56°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi descartado em solução de hipoclorito. O *pellet* foi ressuspensado em 450µL de solução de lavagem (GuHCl 6M, Tris-HCl 60mM) e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Uma nova lavagem com L2 foi realizada. Ao *pellet* foi adicionado 450µL de etanol 70%. O *pellet* foi ressuspensado com o auxílio de vórtex e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante descartado. Uma nova lavagem com etanol 70% foi realizada. Em seguida, foi adicionado ao *pellet*, 450µL de acetona 100%. As amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e, os *ependorfs* contendo os *pellets* das amostras foram colocados em termobloco (*BioPlus*) à 56°C por 30 minutos, com as tampas abertas para a completa eliminação da acetona. Os *pellets* foram ressuspensos em 100µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM – pH=8) com o auxílio de vórtex e incubados em termobloco à 56°C *overnight* (ON). Após este período, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm por 2 minutos. O DNA desprendido da sílica e solubilizado no tampão TE, foi transferido para um novo *ependorf* previamente identificado e armazenado a -20°C.

4.4 Determinação da concentração de DNA das amostras

A quantificação da concentração de DNA de cada amostra foi realizada em *NanoDrop 1000* (*Thermo Scientific*) utilizando-se 1µL da amostra de DNA. De acordo com a concentração obtida, uma alíquota contendo 50ng de DNA era utilizada para a reação de PCR.

4.5 Avaliação dos polimorfismos genéticos

Para a determinação do genótipo dos polimorfismos selecionados, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação pelo método do *Real Time* PCR. A PCR (reação em cadeia da polimerase) é um método de criação de múltiplas cópias de um fragmento específico de DNA *in vitro*.

A síntese de fragmentos de DNA necessita da utilização de um mix contendo os elementos básicos: desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dATP, dGTP, dTTP e dCTP), DNA polimerase (*Taq*), iniciadores (*primers*) e uma solução tampão. 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 fluoróforo 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 sonda está intacta há a transferência de energia entre o fluoróforo e o *quencher* não havendo, dessa forma, emissão de fluorescência. Entretanto, quando a *Taq* polimerase começa a sintetizar o fragmento de DNA a partir do *primer*, sua extremidade 3', com ação exonucleásica, é capaz de clivar a sonda e separar o fluoróforo do *quencher* havendo, dessa forma, liberação de um sinal fluorescente. Este sinal, por sua vez, é capturado por uma câmera presente na máquina de *Real Time* PCR.

Cada alelo possui uma sonda fluorescente diferente sendo possível determinar os genótipos de cada polimorfismo estudado de acordo com a(s) fluorescência(s) produzida(s).

As PCRs foram realizadas utilizando-se *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 apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Identificação dos polimorfismos estudados

Polimorfismo	Posição	Troca de Bases	Cromossomo	Identificação
IL-1 α	- 889	C/T	2q14	rs1800587
IL-1 β	+ 3954	C/T	2q14	rs1143634
IL-1ra	+ 2018	T/C	2q13	rs419598
IL-17A	- 197	A/G	6p12	rs2275913
IL-17F	+ 7488	T/C	6p12	rs763780

Diferentes concentrações de DNA foram testadas, obtendo-se o melhor resultado com a menor quantidade de DNA com a alíquota de 50ng. A quantidade dos demais reagentes para a reação de PCR foi utilizada de acordo com as informações do fabricante e estão expressas na Tabela 3.

Tabela 3 – Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real

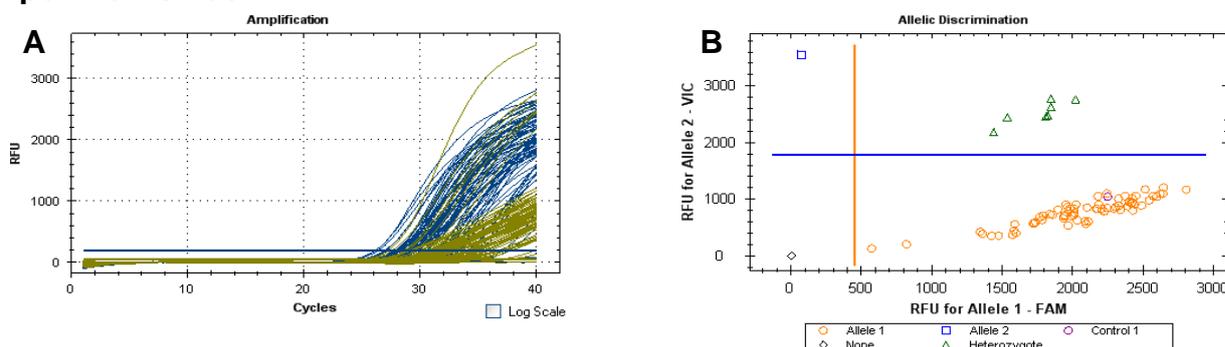
Reagentes	Quantidade
<i>Genotyping Master Mix</i>	10 μ L
<i>Genotyping assay (20X)</i>	1 μ L
DNA genômico	50ng
H ₂ O de injeção	q.s.p 20 μ L

A reação de PCR foi realizada utilizando o termociclador *CFX96TM Real-Time PCR Detection System (BioRad)* e consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 10min, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Essas reações foram realizadas em placas de 96 poços, sendo incluídos um controle negativo e um positivo.

A determinação dos genótipos para cada polimorfismo estudado foi realizada utilizando-se o *software CFX-Manager da Bio-Rad*. Considerando que cada alelo está associado a um fluoróforo diferente, a apresentação de apenas um sinal fluorescente refere-se ao genótipo homocigoto, enquanto a apresentação de dois sinais fluorescentes refere-se ao genótipo heterocigoto.

Gráficos representativos das curvas de amplificação e de discriminação alélica são mostrados na Figura 1.

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



Gráficos representativos do polimorfismo da IL-17F (+7488 T/C). A – curvas de amplificação: azul (FAM) – alelo T; verde (VIC) – alelo C. B – discriminação alélica: homocigoto FAM (círculos alaranjados – TT), homocigoto VIC (quadrado azul – CC), heterocigoto (triângulos verdes – TC), controle positivo (círculo roxo) e controle negativo (losango preto).

4.6 Quantificação da IL-1 β plasmática

Para a quantificação de IL-1 β , amostras sanguíneas de 20 pacientes chagásicos foram coletadas, sendo 10 portadores da forma indeterminada e 10 da forma cardíaca dilatada da doença de Chagas. O sangue dos pacientes foi coletado em tubos contendo anticoagulante e em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 800g para a obtenção do plasma sanguíneo. O plasma obtido foi distribuído em criotubos e armazenado a -80°C.

A concentração da citocina IL-1 β nas amostras de plasma foi determinada pela técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) utilizando-se o *kit Human IL-1 beta DuoSet (DY201) (R&D Systems)*, de acordo com as especificações do fabricante.

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* estatístico *Statistical Package for Social Sciences (SPSS versão 12.0 – IBM corporation, NY, USA)*.

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas estavam em equilíbrio. O teste Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para comparar as frequências alélicas e genotípicas entre os diferentes grupos e também para a análise multivariada. O *Odds Ratio* (OR) foi calculado considerando-se um intervalo de confiança de 95%.

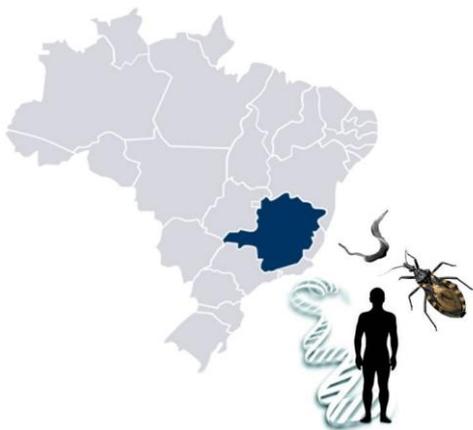
Para avaliar a adequação do tamanho da amostra foi analisado o erro máximo de estimativa.

O teste de *Mann-Whitney U* foi utilizado para comparar diferenças entre dois grupos independentes com distribuição não normal.

Os parâmetros que tiveram um valor de $p < 0,1$ na análise univariada foram selecionados para a análise multivariada. Para esta análise o teste de regressão logística binária foi escolhido objetivando avaliar a influência dos SNPs no desenvolvimento da cardiomiopatia Chagásica crônica.

Para as análises de formação de haplótipos e desequilíbrio de ligação utilizou-se o *software Haploview*.

Valores de p inferior a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.



5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados em duas partes. A primeira parte se refere ao estudo do *cluster* da interleucina-1 e, a segunda parte, ao estudo de dois membros da família da interleucina-17 (IL-17A e IL-17F).

5.1 *Cluster* da interleucina-1

Inicialmente foi realizada a avaliação das frequências dos genótipos esperada *v.s.* observada através do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Considerando-se um nível de significância de 5% e grau de liberdade igual a 1, valores de χ^2 inferiores a 3,84 indicam que a população está em equilíbrio.

Os resultados desta análise estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 – Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para os polimorfismos gênicos da IL-1

Polimorfismo	χ^2
IL-1 α	0,066
IL-1 β	2,259
IL-1ra	0,020

De acordo com os dados obtidos, verifica-se que a população de estudo encontra-se em equilíbrio para os três polimorfismos do *cluster* da IL-1.

5.1.1 Interleucina-1alfa (IL-1 α)

A genotipagem do polimorfismo no gene *IL1A* (-889 C/T) nos diferentes grupos de estudo está expressa na Tabela 5.

A comparação entre os três genótipos nos diferentes grupos não apresentou resultados estatisticamente significativos. Em relação à frequência alélica, foi observado que a variante alélica T é quase duas vezes mais frequente entre os indivíduos cardíacos quando comparados com os indeterminados ($\chi^2=4,09$; OR=1,67; p=0,043; 95%IC=1,01-2,77).

Tendo em vista que a variante alélica T tem sido associada à maior produção da citocina pró-inflamatória IL-1 α (SMITH; HUMPHRIES, 2009), foi também realizada a análise comparando-se a presença (T+) e a ausência (T-) da variante alélica entre os grupos cardíacos e indeterminados. Nesta análise, observou-se que os

portadores da variante T possuem 2 vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca (CND+CD) quando comparado com o grupo indeterminado ($\chi^2=4,59$; OR=2,01; $p=0,032$; 95%IC=1,06-3,82). Resultado similar foi observado quando se comparou o grupo cardíaco dilatado com o grupo indeterminado ($\chi^2=4,44$; OR=2,19; $p=0,035$; 95%IC=1,05-4,55).

Tabela 5 – Frequências genóticas e dos alelos para *IL1A* (-889 C/T)

	Indeterminado (IND) n=59	Cardíaco (C) n=109	Cardíaco Não Dilatado (CND) n=49	Cardíaco Dilatado (CD) n=60	OR	P
Genótipos						
TT	4 (6,8%)	12 (11,0%)	8 (16,3%)	4 (6,7%)		N.S.
CT	21 (35,6%)	53 (48,6%)	20 (40,8%)	33 (55,0%)		
CC	34 (57,6%)	44 (40,4%)	21 (42,9%)	23 (38,3%)		
Alelos						
T	29 (24,6%)	77 (35,3%)	36 (36,7%)	41 (34,2%)	CxIND: 1,67 (1,01-2,77)	0,043
C	89 (75,4%)	141 (64,7%)	62 (63,3%)	79 (65,8%)		
Presença/Ausência						
T+ (TT+CT)	25 (42,4%)	65 (59,6%)	28 (57,1%)	37 (61,7%)	CxIND: 2,01 (1,06-3,82)	0,032
T- (CC)	34 (57,6%)	44 (40,4%)	21 (42,9%)	23 (38,3%)	CDxIND: 2,19 (1,05-4,55)	0,035

Esses resultados demonstram que pacientes chagásicos portadores do alelo T, o qual está relacionado com maior expressão da citocina pró-inflamatória IL1- α , possuem mais chance de desenvolver a forma cardíaca dilatada.

5.1.2 Interleucina-1beta (IL-1 β)

A genotipagem do polimorfismo no gene *IL1B* (+3954 C/T) nos diferentes grupos de estudo está expressa na Tabela 6.

A comparação entre os três genótipos nos diferentes grupos apresentou resultado estatisticamente significativo quando se comparou o grupo cardíaco (CND+CD) com o grupo indeterminado ($\chi^2=6,26$; $p=0,044$). Em relação à frequência alélica, foi observado que a variante alélica T é duas vezes mais frequente entre os indivíduos cardíacos quando comparados com os indeterminados ($\chi^2=5,38$; OR=2,16; $p=0,02$; 95%IC=1,11-4,19). O mesmo foi observado quando se comparou cada um dos grupos cardíacos (CND e CD) com o grupo indeterminado (CND x IND: $\chi^2=4,37$;

OR=2,20; p=0,03; 95%IC=1,03-4,67. CD x IND: $\chi^2=4,27$; OR=2,12; p=0,038; 95%IC=1,02-4,39).

Tabela 6 – Frequências genóticas e dos alelos para *IL1B* (+3954 C/T)

	Indeterminado (IND) n=59	Cardíaco (C) n=109	Cardíaco Não Dilatado (CND) n=49	Cardíaco Dilatado (CD) n=60	OR	p
Genótipos						
TT	2 (3,4%)	6 (5,5%)	3 (6,1%)	3 (5,0%)		CxIND 0,044
CT	9 (15,3%)	34 (31,2%)	15 (30,6%)	19 (31,7%)		
CC	48 (81,3%)	69 (63,3%)	31 (63,3%)	38 (63,3%)		
Alelos						
T	13 (11,0%)	46 (21,1%)	21 (21,4%)	25 (20,8%)	CxIND: 2,16 (1,11-4,19)	0,020
					CNDxIND: 2,20 (1,03-4,67)	0,030
C	105 (89,0%)	172 (78,9%)	77 (78,6%)	95 (79,2%)	CDxIND: 2,12 (1,02-4,39)	0,038
Presença/Ausência						
T+ (TT+CT)	11 (18,6%)	40 (36,7%)	18 (36,7%)	22 (36,7%)	CxIND: 2,53 (1,18-5,42)	0,015
					CNDxIND: 2,53 (1,06-6,08)	0,035
T- (CC)	48 (81,4%)	69 (63,3%)	31 (63,3%)	38 (63,3%)	CDxIND: 2,53 (1,09-5,85)	0,028

Relatos existentes na literatura demonstram que no gene *IL1B*, a variante alélica T também está associada à maior produção desta citocina pró-inflamatória (SMITH; HUMPHRIES, 2009; POCIOT et al., 1992). Portanto, a análise da presença (T+)/ausência (T-) da variante alélica nos grupos cardíacos e indeterminado também foi realizada para complementar os resultados. Quando a presença/ausência da variante alélica T foi comparada nos diferentes grupos, observou-se que os portadores da variante(T+) possuem 2,5 vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca (CND+CD) quando comparado com o grupo indeterminado ($\chi^2=5,90$; OR=2,53; p=0,015; 95%IC=1,18-5,42). Resultado semelhante foi observado quando se comparou cada um dos grupos cardíacos (CND e CD) com o grupo indeterminado (CND x IND: $\chi^2=4,46$; OR=2,53; p=0,035; 95%IC=1,06-6,08. CD x IND: $\chi^2=4,82$; OR=2,53; p=0,028; 95%IC=1,09-5,85).

Esses resultados demonstram que pacientes chagásicos portadores do alelo T para IL-1 β possuem mais chance de desenvolver cardiomiopatia chagásica crônica (não dilatada ou dilatada).

5.1.3 Interleucina-1ra (IL-1ra)

A genotipagem do polimorfismo no gene *IL1RN* (+2018 T/C) nos diferentes grupos de estudo está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 – Frequências genotípicas e dos alelos para *IL1RN* (+2018 T/C)

	Indeterminado (IND) n=59	Cardíaco (C) n=109	Cardíaco Não Dilatado (CND) n=49	Cardíaco Dilatado (CD) n=60	OR	p
Genótipos						
CC	1 (1,7%)	5 (4,6%)	1 (2,0%)	4 (6,7%)		INDxCD 0,046
TC	25 (42,4%)	28 (25,7%)	14 (28,6%)	14 (23,3%)		
TT	33 (55,9%)	76 (69,7%)	34 (69,4%)	42 (70,0%)		
Alelos						
C	27 (22,9%)	38 (17,4%)	16 (16,3%)	22 (18,3%)		N.S.
T	91 (77,1%)	180 (82,6%)	82 (83,7%)	98 (81,7%)		
Presença/Ausência						
C+ (CC+TC)	26 (44,1%)	33 (30,3%)	15 (30,6%)	18 (30,0%)		N.S.
C- (TT)	33 (55,9%)	76 (69,7%)	34 (69,4%)	42 (70,0%)		
TC X TT	25 x 33	28 x 76	14 x 34	14 x 42	INDxCD: 2,27 (1,02-5,04)	0,042

A comparação entre os três genótipos nos diferentes grupos apresentou resultado estatisticamente significativo quando se comparou o grupo indeterminado com o grupo cardíaco dilatado ($\chi^2=6,15$; $p=0,046$). Em relação à frequência alélica, não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa.

De acordo com dados da literatura o alelo C está associado à maior expressão da citocina IL-1ra (DANIS et al., 1995; HURME; SANTILLA, 1998; CARTER et al., 2001). Sendo assim, procedemos a análise comparando a presença (C+) e a ausência (C-) da variante alélica entre o grupo indeterminado e os grupos cardíacos objetivando complementar a análise dos genótipos. Quando a presença/ausência da variante alélica foi analisada entre os grupos, não se observou resultado estatisticamente significativo. Considerando que o genótipo homocigoto (CC) é raro, nesta população, realizou-se então a comparação entre o genótipo heterocigoto (TC) e homocigoto ancestral (TT). Esta análise revelou um resultado significativo quando

se comparou o grupo indeterminado com o cardíaco dilatado ($\chi^2=4,15$; OR=2,27; p=0,042; 95%IC=1,02-5,04).

Esses resultados demonstram que pacientes chagásicos portadores do genótipo TC para IL-1ra possuem menos chance de desenvolver a forma cardíaca dilatada.

5.1.4 Análise multivariada – regressão logística binária

Com o objetivo de verificar possíveis associações dos SNPs no cluster da IL-1 com as formas clínicas da doença de Chagas procedemos à análise multivariada. Foram incluídas nesta análise as comparações cujos valores de p foram < 0,1 na análise univariada.

As combinações analisadas são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Análise multivariada dos polimorfismos *IL1A* (-889 C/T), *IL1B* (+3954 C/T) e *IL1RN* (+2018 T/C)

Combinação de genótipos	Indeterminado (IND) n=59	Cardíaco (C) n=109	Cardíaco Não Dilatado (CND) n=49	Cardíaco Dilatado (CD) n=60	OR	p
IL-1 α (T+) + IL-1ra(C-)	15 (25,4%)	50 (45,9%)	21 (42,8%)	29 (48,3%)	CxIND: 2,50 (1,24-5,00)	0,010
					CDxIND: 2,74 (1,27-5,95)	0,011
IL-1b(T+) + IL-1ra(C-)	7 (11,9%)	30 (27,5%)	12 (24,5%)	18 (30,0%)	CxIND: 2,82 (1,15-6,90)	0,023
					CDxIND: 3,18 (1,22-8,34)	0,018
IL-1a(T+) + IL-1b(T+)	8 (13,6%)	36 (33,0%)	17 (34,7%)	19 (31,7%)	CxIND: 3,14 (1,35-7,32)	0,008
					CNDxIND: 3,39 (1,31-8,75)	0,012
IL-1a(T+) + IL-1b(T+) + IL-1ra(C-)	6 (10,2%)	28 (25,7%)	12 (24,5%)	16 (26,7%)	CDxIND: 2,95 (1,17-7,43%)	0,021
					CxIND: 3,05 (1,18-7,87)	0,021
					CDxIND: 3,21 (1,16-8,91%)	0,025

Pacientes portadores da variante alélica (T+) para IL-1 α , mas que não são portadores da variante alélica para IL-1ra (C-), ou seja, que teoricamente são altos

produtores da citocina pró-inflamatória IL-1 α e baixos produtores da citocina anti-inflamatória IL-1ra, possuem 2,5 vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca (CND+CD) quando comparado com a forma indeterminada ($\chi^2=6,56$; OR=2,50; p=0,010; 95%IC=1,24-5,00). Além disso, os portadores dessa combinação genotípica possuem aproximadamente 3 vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca dilatada quando comparados com os portadores da forma indeterminada ($\chi^2=6,53$; OR=2,74; p=0,011; 95% IC=1,27-5,95).

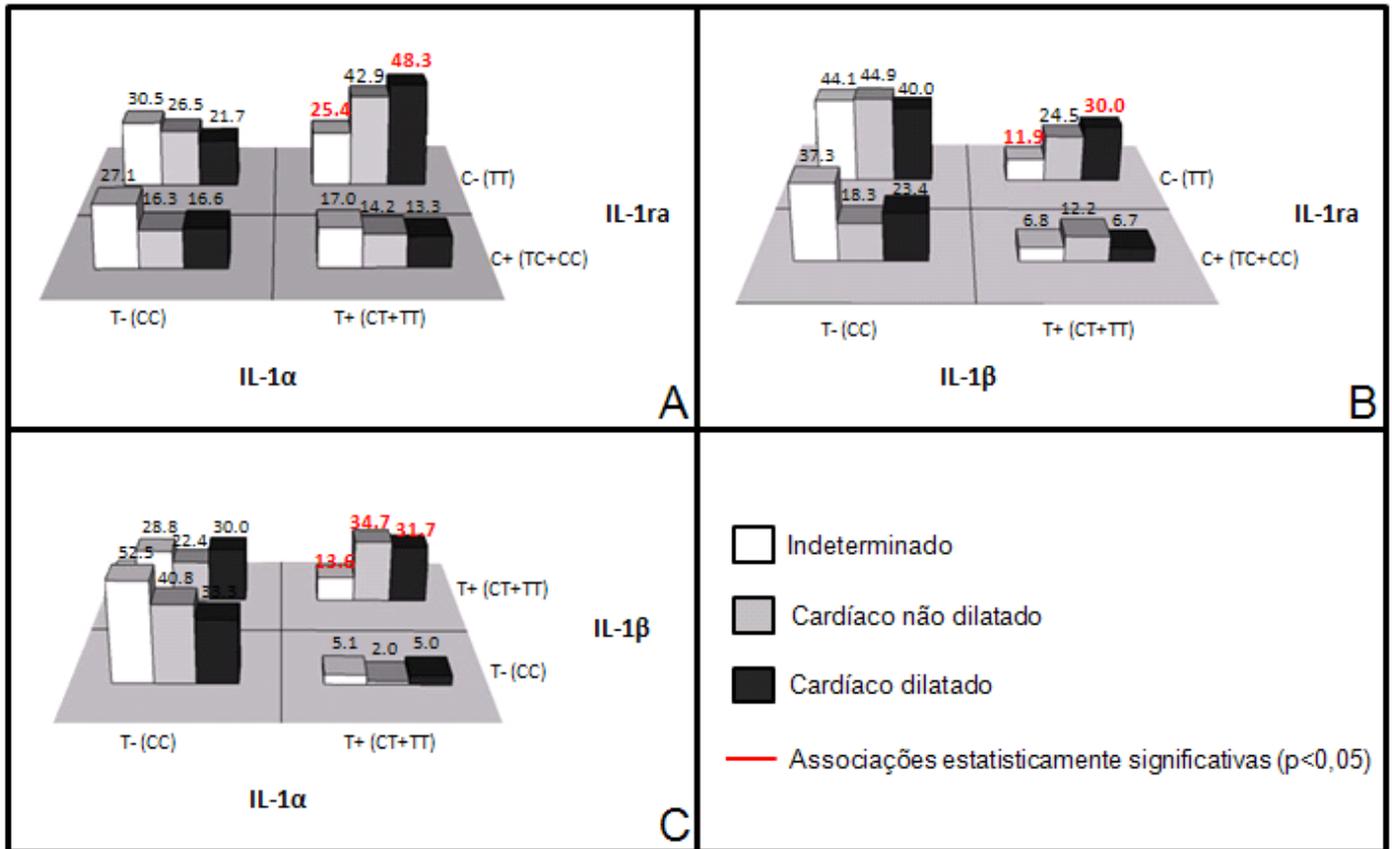
Já os pacientes portadores da variante alélica (T+) para IL-1 β , mas que não são portadores da variante alélica para IL-1ra (C-), ou seja, que teoricamente são altos produtores da citocina pró-inflamatória IL-1 β e baixos produtores da citocina anti-inflamatória IL-1ra, possuem aproximadamente 3 vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca ($\chi^2=5,17$; OR=2,82; p=0,023; 95%IC=1,15-6,90) e 3 vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca dilatada ($\chi^2=5,55$; OR=3,18; p=0,018; 95%IC=1,22-8,34) quando comparados com a forma indeterminada.

Pacientes que possuem genótipo teoricamente alto produtor tanto para a IL-1 α quanto para a IL-1 β , ou seja, são portadores de ambas as variantes alélicas T, possuem 3 vezes mais chance de desenvolver a formas cardíacas quando comparados com a forma indeterminada da doença de Chagas (Cardíaco x IND: $\chi^2=7,05$; OR=3,14; p=0,008; 95%IC=1,35-7,32. CND x IND: $\chi^2=6,34$; OR=3,39; p=0,012; 95%IC=1,31-8,75. CD x IND: $\chi^2=5,30$; OR=2,95; p=0,021; 95%IC=1,17-7,43).

Os resultados dessas três análises multivariadas também estão expressos na forma de gráfico (Figura 2).

Aqueles pacientes que são portadores das variantes alélicas (T+) para IL-1 α e IL-1 β e não são portadores da variante alélica (C-) para IL-1ra, ou seja, que teoricamente são altos produtores das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e β e baixos produtores da citocina anti-inflamatória IL-1ra, possuem 3 vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca ($\chi^2=5,33$; OR=3,05; p=0,021; 95%IC=1,18-7,87) e cardíaca dilatada ($\chi^2=5,03$; OR=3,21; p=0,025; 95%IC=1,16-8,91) quando comparados com a forma indeterminada.

Figura 2 – Gráficos representativos da análise multivariada



Distribuição genotípica (%) das variantes polimórficas *IL1A* (-889 C/T), *IL1B* (+3954C/T) e *IL1RN* (+2018T/C). A – Frequência de pacientes portadores da combinação *IL1A* (-889) + *IL1RN* (+2018). B – Frequência de pacientes portadores da combinação *IL1B* (+3954) + *IL1RN* (+2018). C – Frequência de pacientes portadores da combinação *IL1A* (-889) + *IL1B* (+3954).

Esses resultados demonstram que a associação de genótipos alto produtores (T+) para IL-1 α , IL-1 β com o genótipo baixo produtor (C-) para IL-1ra aumentam ainda mais as chances dos pacientes chagásicos em desenvolver a forma cardíaca dilatada da doença.

5.1.5 Avaliação da formação de haplótipos e análise de desequilíbrio de ligação

Considerando que os polimorfismos no *cluster* da IL-1 estão localizados no mesmo cromossomo (chr. 2), foi realizada a avaliação da formação de haplótipos e análise de desequilíbrio de ligação.

O termo “haplótipo” (genótipo haplóide) refere-se à combinação de alelos marcadores num mesmo cromossomo. O grau de associação entre dois polimorfismos pode ser medido por meio de métodos estatísticos e indicar se estão

em desequilíbrio de ligação, ou seja, se estão formando uma estrutura haplótípica (ZHAO et al., 2003).

Os resultados dessa análise demonstraram que os polimorfismos estudados não formam haplótipos e, portanto, não estão em desequilíbrio de ligação.

5.1.6 IL-1 β plasmática em amostras de pacientes chagásicos

Em função do importante papel da IL-1 β em doenças cardíacas, foi realizada a dosagem desta citocina no plasma sanguíneo de 20 pacientes chagásicos, sendo 10 pacientes portadores da forma indeterminada e 10 da forma cardíaca dilatada.

Na Figura 3 estão os resultados dessa análise.

Figura 3 - IL-1 β plasmática em amostras de pacientes chagásicos

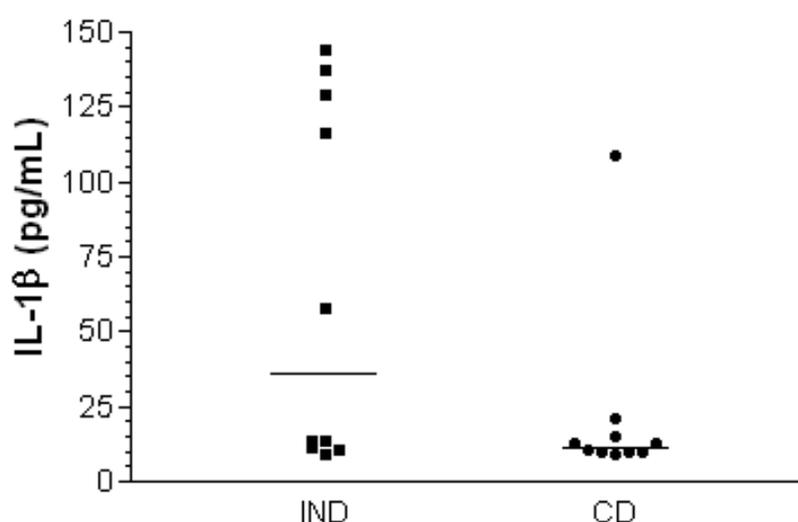


Gráfico representativo da dosagem da IL-1 β . Quadrado – pacientes indeterminados. Círculo – pacientes cardíacos dilatados. Traço – mediana.

Esses resultados demonstram que há uma grande variabilidade dentro do mesmo grupo, o que pode estar associado com a imunogenética do paciente em relação ao polimorfismo da IL-1 β . Os valores das medianas para os grupos indeterminado e cardíaco dilatado são, respectivamente, 35,9 e 11,7pg/mL. Apesar de alguns pacientes indeterminados apresentarem níveis plasmáticos de IL-1 β mais elevados do que os pacientes cardíacos dilatados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,545$; *Mann-Whitney U=42,0*).

5.2 Interleucina-17

Inicialmente foi realizada a avaliação das freqüências dos genótipos esperada *v.s.* observada através do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Considerando um nível de significância de 5% e grau de liberdade igual a 1, valores de χ^2 inferiores a 3,84 indicam que a população está em equilíbrio.

Os resultados desta análise estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9 – Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para os polimorfismos gênicos da IL-17

Polimorfismo	χ^2
IL-17A	1,338
IL-17F	1,437

Conforme os dados obtidos, a população de estudo encontra-se em equilíbrio para os dois polimorfismos da família das interleucinas 17.

5.2.1 Interleucina-17A (IL-17A)

Na tabela 10 são apresentadas as genotipagens do polimorfismo no gene *IL17A* (-197 A/G) nos diferentes grupos de estudo.

Tabela 10 – Freqüências genotípicas e dos alelos para *IL17A* (-197 A/G)

	Indeterminado (IND) n=59	Cardíaco (C) n=109	Cardíaco Não Dilatado (CND) n=49	Cardíaco Dilatado (CD) n=60	OR	p
Genótipos						
AA	4 (6,8%)	6 (5,5%)	2 (4,1%)	4 (6,7%)		CDxIND 0,042
GA	24 (40,7%)	27 (24,8%)	15 (30,6%)	12 (20,0%)		
GG	31 (52,5%)	76 (69,7%)	32 (65,3%)	44 (73,3%)		
Alelos						
A	32 (27,1%)	39 (17,9%)	19 (19,4%)	20 (16,7%)	CxIND: 1.71 (1,00-2,91)	0,048
G	86 (72,9%)	179 (82,1%)	79 (80,6%)	100 (83,3%)		
Presença/Ausência						
A+ (AA+GA)	28 (47,5%)	33 (30,3%)	17 (34,7%)	16 (26,7%)	CxIND: 2.08 (1,08-4,00)	0,027
A- (GG)	31 (52,5%)	76 (69,7%)	32 (65,3%)	44 (73,3%)	CDxIND: 2.48 (1,15-5,35)	0,019

A análise dos três genótipos nos diferentes grupos mostrou resultado estatisticamente significativo quando se comparou o grupo cardíaco dilatado com o indeterminado ($\chi^2=6,33$; $p=0,042$). Em relação à frequência alélica, foi observado que a variante alélica G é significativamente mais frequente entre os indivíduos cardíacos quando comparados com os indeterminados ($\chi^2=3,91$; $OR=1,71$; $p=0,048$; $95\%IC=1,00-2,91$).

Considerando que o alelo ancestral (A) está relacionado à maior produção desta citocina pró-inflamatória (ESPINOZA et al., 2011), foi realizada a análise comparando-se a presença (A+) e a ausência (A-) do alelo alto produtor entre os grupos cardíacos e indeterminados. Esta análise revelou que os não portadores do alelo A (GG) possuem 2 vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca (CND+CD) quando comparado com o grupo indeterminado ($\chi^2=4,89$; $OR=2,08$; $p=0,027$; $95\%IC=1,08-4,00$). Essa chance aumentou para 2,5 quando se comparou o grupo cardíaco dilatado com o grupo indeterminado ($\chi^2=5,52$; $OR=2,48$; $p=0,019$; $95\%IC=1,15-5,35$).

Esses resultados demonstram que, do ponto de vista imunogenético, pacientes chagásicos portadores do genótipo GG, que teoricamente expressam menor quantidade da citocina IL17A, possuem maior chance de desenvolver a forma cardíaca dilatada da doença de Chagas.

5.2.2 Interleucina-17F (IL-17F)

A genotipagem do polimorfismo no gene *IL17F* (+7488 T/C) nos diferentes grupos de estudo é apresentada na Tabela 11.

A análise dos três genótipos nos diferentes grupos não mostrou resultados estatisticamente significativos quando se comparou os grupos cardíacos com o grupo indeterminado. O mesmo foi observado para a frequência alélica.

Estudos já demonstraram que a variante alélica C no gene *IL17F* está associado à menor produção desta citocina (KAWAGUCHI et al., 2006). Portanto, a análise comparando-se a presença (C+) e a ausência (C-) da variante alélica entre os grupos cardíaco e indeterminado também foi realizada, entretanto, esta análise também não apresentou resultados significativos.

Tabela 11 – Frequências genotípicas e dos alelos para *IL17F* (+7488 T/C)

	Indeterminado (IND) n=59	Cardíaco (C) n=109	Cardíaco Não Dilatado (CND) n=49	Cardíaco Dilatado (CD) n=60	OR	p
Genótipos						
CC	2 (3,4%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		N.S.
TC	5 (8,5%)	16 (14,7%)	5 (10,2%)	11 (18,3%)		
TT	52 (88,1%)	93 (85,3%)	44 (89,8%)	49 (81,7%)		
Alelos						
C	9 (7,6%)	16 (7,3%)	5 (5,1%)	11 (9,2%)		N.S.
T	109 (92,4%)	202 (92,8%)	93 (94,9%)	109 (90,8%)		
Presença/Ausência						
C+ (CC+TC)	7 (11,9%)	16 (14,7%)	5 (10,2%)	11 (18,3%)		N.S.
C- (TT)	52 (88,1%)	93 (85,3%)	44 (89,8%)	49 (81,7%)		

Esses resultados sugerem que o polimorfismo da *IL-17F* (+7488 T/C) não está associado com a doença de Chagas na população brasileira.

5.3 Adequação do tamanho da amostra

Para avaliar se o tamanho amostral estava adequado calculou-se o erro máximo de estimativa. Esse teste permite verificar a diferença máxima entre a média amostral e a média populacional.

O valor encontrado para o erro máximo de estimativa foi de 7,56%, demonstrando que a amostra utilizada (n=168 pacientes portadores da doença de Chaga) está adequada.



6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Diferenças individuais da resposta imune na doença de Chagas sugerem que a genética humana pode estar envolvida neste processo. Nesse sentido, estudo de polimorfismos genéticos tem fornecido novos conhecimentos que podem explicar, pelo menos parcialmente, a evolução clínica diferencial dos indivíduos infectados por *T. cruzi*. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) funcionais têm sido associados à suscetibilidade a diversas doenças infecciosas, auto-imunes e auto-inflamatórias (DUTRA et al., 2009; KUBISTOVA et al., 2009; GREGERSEN; OLSSON, 2009). Polimorfismos funcionais são capazes de alterar a taxa de transcrição gênica, a estabilidade do RNA mensageiro e, a qualidade e atividade da proteína sintetizada (WITKIN et al., 2002).

O presente estudo, realizado com pacientes chagásicos do estado de Minas Gerais, revelou associações estatisticamente significativas dos polimorfismos nos genes *IL1A* (-889) e *IL1B* (+3954) com o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica. A presença da variante alélica T em ambos os genes está associada a maior chance de desenvolvimento da CCC (OR=2,01 e OR=2,53; respectivamente). Resultado similar foi observado na análise de frequência do alelo T (OR=1,67 e OR=2,16; respectivamente). Entretanto, quando o grupo de pacientes cardíacos foi dividido em cardíacos não dilatados e cardíacos dilatados, o grupo dos não dilatados mostrou associação apenas para o polimorfismo *IL1B* (+3954).

De acordo com os dados do NCBI, a presença da variante alélica T (TC + TT), para a *IL-1 α* , nas diferentes populações é bastante variável, mostrando frequência intermediária na população européia (43,4%), elevada frequência na população sub-saariana (69,9%) e baixa na asiática japonesa (9,3%) e chinesa (23,2%). A presença da variante alélica (T+) em nossa população de estudo variou de 42,4% (grupo indeterminado) a 59,6% (grupo cardíaco), indicando um valor intermediário entre as populações européia e africana no grupo de pacientes cardíacos. A frequência do alelo T para o polimorfismo da *IL-1 α* variou de 24,6% (grupo indeterminado) a 35,3% (grupo cardíaco). Quando se compararam esses resultados com os dados do NCBI, novamente observou-se que a frequência deste alelo no grupo de pacientes cardíacos está entre a observada na população européia (25,2%) e africana sub-saariana (46,0%), ambas com grande influência na formação genética da população brasileira (PENA et al., 2011).

Em relação à IL-1 β , a presença do alelo T (CT +TT), variou entre 18,6% (grupo indeterminado) e 36,7% (grupo cardíaco). Na população européia, de acordo com dados do NCBI, a presença deste alelo é de 36,3%, enquanto que na população sub-saariana é de 16%. Neste caso, observa-se que cada um dos grupos estudados se aproxima mais de uma determinada população. Porém, a comparação da frequência alélica mostrou que a população estudada apresenta uma frequência intermediária (11,0% - indeterminados, 21,1% - cardíacos) entre as populações européia (25,0%) e sub-saariana (10,0%), sugerindo um resultado miscigenado entre essas populações. A introdução de marcadores genéticos de etnicidade é um fator importante para se determinar a herança das populações fundadoras em relação a estes polimorfismos na população brasileira e será realizada futuramente por nosso grupo de pesquisa.

Como mencionado anteriormente, a presença da variante alélica T na posição -889 do gene *IL1A* e o genótipo TT na posição +3954 do gene *IL1B* foram correlacionados com níveis aumentados das citocinas IL-1 α e IL-1 β , respectivamente (SMITH; HUMPHRIES, 2009; POCIOT et al., 1992). Além disso, o SNP sinônimo *IL1B* (+3954 C/T), única variante comum presente na região codificadora da IL-1 β , é provavelmente um marcador do SNP funcional -31T/C, relacionado à mais elevada expressão da IL-1 β (SMITH; HUMPHRIES, 2009).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que a variante alélica T nos genes *IL1A* e *IL1B*, presentes em maior frequência nos pacientes chagásicos cardíacos em comparação aos indeterminados, podem exercer influência no curso diferencial da doença de Chagas.

Por outro lado, estudo desenvolvido por Flórez e colaboradores (2006), realizado com pacientes chagásicos colombianos não encontrou resultados significativos para esses mesmos polimorfismos, *IL1A* (-889) e *IL1B* (+3954), entre as formas cardíaca e assintomática da doença. Entretanto, este mesmo estudo revelou que o haplótipo CT para os polimorfismos da IL-1 β , *IL1B* (-31 T/C) e *IL1B* (+3954 C/T), está associado com o risco de desenvolvimento da doença e, ainda, que o alelo G do polimorfismo *IL1B* (+5810 G/A) também está associado à forma cardíaca da doença.

Até aonde é de nosso conhecimento, este estudo colombiano é o único trabalho realizado com os polimorfismos *IL1A* (-889) e *IL1B* (+3954) em portadores da doença de Chagas.

Em trabalho realizado com brasileiros portadores de periodontite crônica, Moreira e colaboradores, em nosso laboratório (2005; 2007), demonstraram associação da variante alélica T tanto para o polimorfismo no gene *IL1A* (-889) quanto para *IL1B* (+3954) com o desenvolvimento da doença. Assim como a doença de Chagas, a doença periodontal é caracteristicamente inflamatória, sugerindo que polimorfismos presentes em genes codificadores dessas citocinas pró-inflamatórias podem influenciar no curso da doença.

Em relação a IL-1ra, o polimorfismo no gene *IL1RN* (+2018) mostrou uma baixa frequência para o genótipo variante (CC) na população estudada, tanto para os pacientes indeterminados quanto para os cardíacos, o que dificultou as análises estatísticas. Esse resultado está de acordo com os dados do NCBI relativos à frequência deste polimorfismo em diferentes populações. Por outro lado, uma alta frequência do genótipo heterozigoto (TC) nos pacientes indeterminados permitiu verificar uma diferença estatisticamente significativa em relação aos pacientes cardiopatas dilatados (OR=2,27). Além disso, a frequência da variante alélica, associada ao aumento da expressão de IL-1ra, foi mais elevada em pacientes indeterminados.

A IL-1ra é uma citocina anti-inflamatória, pertencente à família IL-1, que se liga ao receptor I da IL-1 (IL-1RI) e atua como um inibidor competitivo que impede as ações pró-inflamatórias da IL-1 α e IL-1 β (AREND, 2002). O polimorfismo avaliado em nosso estudo, IL-1ra (+2018T/C), está em 100% de desequilíbrio de ligação (Carter et al., 2000) com o polimorfismo funcional *IL1RN* (VNTR), cujo alelo 2 está relacionado com produção mais elevada de IL-1ra (Danis et al., 1995; Hurme and Santilla, 1998). Dessa forma, é possível dizer que a variante alélica (C) está associada à maior produção da citocina. Portanto, nossos resultados sugerem que a frequência aumentada do alelo C no grupo de pacientes indeterminados possa exercer um papel anti-inflamatório.

Contrariamente, estudo realizado com pacientes chagásicos mexicanos apresentou uma forte associação do genótipo variante (CC) para o polimorfismo gênico *IL1RN* (+2018) e a forma cardíaca da doença de Chaga (CRUZ-ROBLES et al., 2009). Esse resultado contraditório pode ser atribuído às diferenças etno-geográficas, bem como pelo tamanho das amostras dos estudos.

Em concordância com nossos dados, a frequência da variante alélica C para o polimorfismo no gene *IL1RN* (+2018) mostrou-se significativamente maior no grupo

controle do que no grupo com periodontite crônica em estudo realizado com indivíduos japoneses (KOMATSU et al., 2008). Os autores sugeriram que o alelo C pode estar associado à menor suscetibilidade a doença periodontal. Além disso, este estudo demonstrou que os indivíduos heterozigotos (TC) para o polimorfismo são menos propensos a desenvolver a periodontite crônica. Esses achados são similares aos obtidos por nós no presente estudo, realizado com pacientes chagásicos, no qual a presença do alelo C, bem como da variante genotípica TC, sugere proteção ao desenvolvimento da CCC.

A análise multivariada entre os polimorfismos no cluster da *IL1* permitiu-nos correlacionar presença do alelo T (alto produtor) para $IL-1\alpha$ e $IL-1\beta$ com ausência do alelo C (alto produtor) para $IL-1ra$, ou seja, permitiu-nos verificar o balanço entre as influências pró-inflamatórias da $IL-1\alpha$ e $IL-1\beta$ (alto produtor) e anti-inflamatória da $IL-1ra$ (baixo produtor), do ponto de vista imunogenético.

As comparações demonstraram que os pacientes portadores do alelo T para *IL1A* (-889) e que, simultaneamente, não são portadores do alelo C para *IL1RN* (+2018) possuem maior chance de desenvolver a forma cardíaca dilatada (OR=2,74). O mesmo foi observado para os portadores do alelo T para *IL1B* (+3954) e não portadores do alelo C para *IL1RN* (+2018) (OR=3,18). Esses dados demonstram que no grupo de pacientes cardíacos dilatados há um desbalanço imunogenético entre os genes codificadores das citocinas pró-inflamatórias ($IL-1\alpha$ e $IL-1\beta$) e anti-inflamatória ($IL-1ra$), tendendo para um perfil genético mais inflamatório neste grupo, em comparação com os indeterminados e cardíacos não dilatados.

Em relação aos pacientes portadores, simultaneamente, do alelo T para *IL1A* (-889) e para *IL1B* (+3954), verificamos que os portadores de ambas as variantes alélicas possuem mais chance de desenvolver a forma não dilatada (OR=3,39) como também a forma dilatada (OR=2,95) da doença de Chagas cardíaca. Entretanto, quando a presença simultânea dos alelos T para $IL-1\alpha$ e $IL-1\beta$ foram associados a ausência do alelo C para *IL1RN* (+2018), o resultado mostrou-se estatisticamente significativo somente para o grupo de pacientes cardíacos dilatados (OR=3,21).

Em condições fisiológicas normais, o balanço entre as citocinas pró-inflamatórias ($IL-1\alpha$ e $IL-1\beta$) e anti-inflamatória ($IL-1ra$) parece exercer um importante papel, de forma que um desbalanço causado por elevada produção de $IL-1$ (α e β) e/ou baixa

produção de IL-1ra predispõe ao desenvolvimento de patologias decorrentes de processo inflamatório exacerbado e injúria tecidual (AREND, 2002).

Dessa forma, do ponto de vista funcional, é possível que os polimorfismos genéticos estudados possam afetar o balanço entre as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α e IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-1ra) da família IL-1, constituindo um aspecto relevante na predisposição e progressão da doença de Chagas cardíaca.

Os níveis plasmáticos da IL-1 β em pacientes chagásicos indeterminados e cardíacos foram quantificados e, surpreendentemente, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Dados contraditórios entre níveis plasmáticos de IL-1 β e presença do alelo T foram observados num estudo realizado com pacientes com artrite reumatóide (BUCHS et al., 2001). A gravidade da doença também foi associada com a presença do alelo T do gene *IL1B* (+3954), porém os pacientes portadores desta variante alélica apresentaram níveis mais baixos de IL-1 β plasmática, correlacionados também com mais baixos níveis de IL-1ra. Os autores sugeriram que a gravidade da doença estaria associada com um desbalanço entre IL-1 β e IL-1ra (BUCHS et al., 2001).

No nosso estudo, poderíamos inferir que os níveis plasmáticos da IL-1 β podem não estar refletindo os níveis encontrados nos tecidos inflamados. Partindo do pressuposto de que pacientes cardíacos expressam menos IL-1ra, um inibidor competitivo do receptor de IL-1 (α e β), haveria maior probabilidade de ligação da IL-1 β nos tecidos e, conseqüentemente, esta citocina estaria em menor concentração no compartimento plasmático. Inversamente, pacientes indeterminados expressando mais IL-1ra, teriam a probabilidade de ligação da IL-1 β ao seu receptor diminuída, o que resultaria em níveis plasmáticos mais elevados de IL-1 β nestes pacientes. Além disso, deve-se mencionar que os pacientes indeterminados não apresentam inflamação significativa no miocárdio, em comparação com pacientes cardíacos (LOPES et al., 1981).

Outra possibilidade que não pode ser descartada é a cinética de ligação da IL-1 α e IL-1 β aos seus receptores, o que poderia influenciar nos níveis plasmáticos da IL-1 β . Desta forma, outros estudos ainda precisam ser realizados para confirmar esses dados. Enquanto a IL-1ra normalmente é encontrada nos fluidos corporais de indivíduos saudáveis (em concentrações da ordem de ng/mL) a IL-1 α e IL-1 β não são detectáveis. Em várias situações patológicas, a IL-1 β torna-se detectável na

circulação (em concentrações da ordem de pg/mL), porém a IL-1 α não, pois é uma citocina primariamente citosólica ou ancorada à membrana celular (DINARELLO, 1996; AREND, 2002). Levando em consideração estas observações, decidimos proceder a determinação dos níveis plasmáticos de IL-1 β em pacientes indeterminados e cardíacos dilatados, pois possíveis alterações desta citocina poderia mostrar um resultado diferencial mais efetivo.

Em síntese, nossos resultados mostram que polimorfismos em genes codificadores da família IL-1 (IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra) estão associados com resultado clínico diferencial da doença de Chagas. Nós sugerimos que os polimorfismos genéticos *IL1A* (-889C/T), *IL1B* (+3954C/T) e *IL1RN* (+2018T/C) podem levar a um desequilíbrio no balanço entre as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (IL-1ra), levando à maior predisposição ao desenvolvimento da doença de Chagas cardíaca e, de maneira mais acentuada, à cardiomiopatia dilatada.

Em relação à citocina IL-17, seu papel na doença de Chagas ainda não está estabelecido. Os poucos estudos envolvendo esta citocina se referem a infecção aguda em modelos experimentais. Por outro lado, o envolvimento do IFN- γ e da IL-10 tem sido extensamente estudado. Diversos relatos existentes na literatura têm apontado para um padrão predominante de citocinas inflamatórias na CCC, caracterizado principalmente por elevados níveis de IFN- γ e TNF- α , enquanto que em pacientes indeterminados há uma predominância de um padrão imunomodulatório de resposta, representado principalmente pela IL-10 (GOMES et al., 2003; SOUZA et al., 2004; VITELLI-AVELAR et al., 2008; ARAÚJO et al., 2011). Esses dados sugerem que um delicado balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias constitui o aspecto central na evolução clínica diferencial da doença de Chagas.

No presente trabalho, o estudo do SNP *IL17A* (-197 A/G) mostrou relevante associação com o desenvolvimento de CCC. O genótipo GG, o qual está relacionado com baixa expressão da IL-17A, foi significativamente mais freqüente entre os pacientes cardíacos (69,7%) em comparação com os indeterminados (52,5%), indicando duas vezes mais chance de desenvolver a forma cardíaca da doença nos portadores deste genótipo (OR=2,08).

De acordo com os dados do NCBI, a frequência do genótipo GG é heterogênea, variando de acordo com as diferentes etnias (Européia: 41,6%; Asiática chinesa:

23,3%; Asiática japonesa: 30,2%; Africana sub-saariana: 81,7%). Comparando-se nossos resultados a estes mencionados, verificamos que a frequência genotípica para este polimorfismo na população brasileira é ainda diferente: nos pacientes analisados neste estudo observamos uma variação entre 53-73%, mostrando um valor intermediário entre a população européia e sub-saariana, ambas sabidamente envolvidas na formação genética da população brasileira (PENA et al., 2011).

Estudos simultâneos de dois grupos independentes (PARK et al., 2005 e HARRINGTON et al., 2005), identificando uma nova subpopulação de células T CD4+ produtoras de IL-17 (atualmente denominadas Th17), mostraram que a diferenciação e expansão dessas células, bem como a expressão de IL-17 pelas mesmas, são negativamente reguladas por IFN- γ , IL-12 e IL-4. Considerando que o padrão dominante nos pacientes cardíacos é o elevado nível de IFN- γ , seria de se esperar que estes pacientes apresentassem expressão mais baixa de IL-17A. De fato, nós observamos que o genótipo GG é predominante no grupo de pacientes cardíacos. Além disso, estudo realizado em nosso laboratório mostrou que linfócitos totais e células Th17 de pacientes chagásicos cardíacos apresentam expressão mais baixa de IL-17 em comparação aos indivíduos não infectados e indeterminados. A análise de correlação entre expressão da IL-17 e função cardíaca (fração de ejeção e diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo) mostrou que a IL-17 está associada com melhor estado clínico na doença de Chagas humana (MAGALHÃES et al., 2011).

O papel protetor da IL-17 também foi observado em indivíduos resistentes ao Kalazar causado por *Leishmania donovani*. Células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados, porém resistentes à doença, produziram níveis mais elevados de IL-17 (e também IL-22) do que de indivíduos que desenvolveram a leishmaniose visceral (PITTA et al., 2009).

Considerando que a IL-17A é uma citocina pró-inflamatória produzida por diversos tipos celulares (CUA; TATO, 2010), não podemos descartar a possibilidade de sua ação na fase aguda da infecção por *T. cruzi*. É possível que esta citocina, juntamente com outros fatores, exerça um importante papel na eliminação do parasito na fase inicial e, posteriormente, também atue modulando a produção de IFN- γ .

Pesquisa realizada em modelo experimental utilizando camundongos T-bet^{-/-} infectados com *T. cruzi*, mostraram que a inibição da produção de IL-17 se deve à ação do fator de transcrição T-bet (fator de transcrição do IFN- γ) e não propriamente de IFN- γ ou IL-12 (COBB et al., 2010; GUO et al., 2009). Dessa forma, é possível que a regulação negativa da produção de IL-17 seja exercida pelo fator de transcrição T-bet.

Por outro lado, estudo de doença inflamatória intestinal em modelo experimental mostrou que camundongos IL-17^{-/-} apresentavam acentuada inflamação associada com altos níveis de IFN- γ , sugerindo que a IL-17 exerce um efeito protetor pela inibição da produção de IFN- γ (O'CONNOR et al., 2009).

Cabe destacar que existem dois tipos de receptores para IL-17A amplamente distribuídos. O receptor IL-17RA está presente em células do tecido linfóide e, o receptor IL-17RC, em tecidos não hematopoéticos (IWAKURA et al., 2008). Dessa forma, Awasthi e Kuchroo (2009b) propõem um modelo, no qual a IL-17 produzida por células Th17 são capazes de se ligar ao receptor de IL-17 (IL-17RA) presente na superfície de células Th1 e inibir o fator de transcrição T-bet. Esses estudos, em conjunto, sugerem uma inibição recíproca entre células Th1 e Th17.

Considerando que a doença de Chagas cardíaca é caracterizada por acentuada resposta Th1, como mencionado anteriormente, é possível hipotetizar que níveis mais baixos de IL-17, encontrados em portadores do genótipo GG, contribuam para a ocorrência de mais altos níveis de IFN- γ . Inversamente, elevados níveis de IL-17A, relacionados ao genótipo A+ (AG ou AA), contribuiriam para mais baixos níveis de IFN- γ . Essa possível influência recíproca entre IFN- γ e IL-17 poderia, eventualmente, também explicar resultados contraditórios em relação à expressão de IFN- γ em pacientes chagásicos.

Em experimentos utilizando culturas de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) obtidas de pacientes indeterminados e cardíacos e, estimuladas com antígenos de *T. cruzi*, os resultados mostraram-se contraditórios em relação a produção de IFN- γ . Enquanto Gomes e colaboradores (2003) encontraram baixa produção de IFN- γ (e alta produção de IL-10) em pacientes com a forma indeterminada e alta produção de IFN- γ nos portadores da forma cardíaca da doença de Chagas, Laucella e colaboradores (2004) observaram mais alta produção desta citocina no grupo de pacientes indeterminados em comparação com os cardíacos.

Esses resultados opostos, eventualmente, poderiam ser explicados pelo mecanismo de inibição direta das células Th1 (produtoras de IFN- γ) pela citocina IL-17A. De acordo com O'Connor e colaboradores (2009), o efeito inibitório da IL-17 sobre as células Th1 em meio de cultura somente é observável após 96 horas, quando a expressão do receptor A para IL-17 (IL-17RA) sobre as células T é substancial. Nesse sentido, a baixa produção de IFN- γ foi verificada por Gomes e colaboradores (2003) no 6º dia de cultura, enquanto que a alta produção detectada por Laucella e colaboradores (2004) em CMSP dos indeterminados foi verificada entre 16-20 horas de cultura. Portanto, as diferenças observadas podem ser devido às condições experimentais, onde o tempo insuficiente para a expressão do receptor para IL-17 tenha impedido a ação inibitória da IL-17 sobre a secreção de IFN- γ .

Em relação ao polimorfismo da IL-17F (+7488T/C), nossos resultados demonstraram que o genótipo CC é raro na população estudada (3,4% no grupo indeterminado e 0% no grupo cardíaco). Segundo os dados do NCBI, a frequência do genótipo CC, de fato, é rara em diversas populações (Européia: 0%; Asiática chinesa: 0%; Asiática japonesa: 1,2%; Africana sub-saariana: 0%). Entretanto, a frequência do genótipo heterozigoto (TC) é variável nas diferentes populações, sendo mais frequente entre os asiáticos chineses e japoneses (25,6% e 23,3%, respectivamente), e em menor frequência nas etnias européia (9,7%) e africana (15,9%). Nossos dados mostraram uma variação de frequência do genótipo TC entre 8,5-18,3%, refletindo valores próximos aos encontrados nas populações européia e africana. A associação desses dados às análises de marcadores genotípicos de etnia é um ponto que abordaremos em estudos futuros, como mencionado.

É importante destacar que o presente estudo é o primeiro a demonstrar uma associação significativa entre os três polimorfismos do *cluster* da IL-1 na população chagásica brasileira e, também é o primeiro a avaliar polimorfismos da citocina IL-17 na doença de Chagas humana.

Estudos de polimorfismos em genes codificadores de mediadores imunes, tanto da imunidade inata quanto da adquirida, têm contribuído na diferenciação do curso clínico da doença de Chagas. Os resultados aqui apresentados contribuem para a consolidação da concepção de que a imunogenética do hospedeiro humano é complexa devido ao concomitante envolvimento de diversos polimorfismos gênicos

no estabelecimento da resultante do indivíduo. Não obstante, este trabalho deixa clara a participação fundamental das características genéticas do hospedeiro na definição do tipo de resposta que resultará da interação *T. cruzi*-hospedeiro.



7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O estudo dos SNPs nos genes codificadores das citocinas da família IL-1 e das citocinas IL-17A e IL-17F, realizada numa amostra da população brasileira, permitiram-nos chegar às seguintes conclusões:

- ❖ O polimorfismo no gene *IL1A* na região promotora (-889 C/T) está associado ao desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica dilatada.
- ❖ O polimorfismo no gene *IL1B* na região de transcrição (+3954 C/T) está associado ao desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica não dilatada e dilatada.
- ❖ O polimorfismo no gene *IL1RN* na região de transcrição (+2018 T/C) está associado ao desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica dilatada.
- ❖ A análise multivariada dos polimorfismos no *cluster* na IL-1 possibilitou verificar a associação de um perfil mais pró-inflamatório, do ponto de vista imunogenético, com maior chance de desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica.
- ❖ O polimorfismo no gene *IL17A* na região promotora (-197 A/G) está associado ao desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica dilatada.
- ❖ O polimorfismo no gene *IL17F* na região de transcrição (+7488 T/C) não está associado ao desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F. F. et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS Neglected Tropical Disease**. V. 5, p. e992, 2011.

AREND, W. P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 223, p. 20-38, 2002.

ARISAWA, T. et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 28, p. 44-49, 2008.

AWASTHI, A.; KUCHROO, V. K. Th17 cells: from recursors to players in inflammation and infection. **International Immunology**, v. 21, p. 489–498, 2009a.

AWASTHI, A.; KUCHROO, V. K. IL-17A directly inhibits Th1 cells and thereby suppresses development of intestinal inflammation. **Nature Immunology**, v. 6, p. 568–570, 2009b.

BERAÚN, Y. et al. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. **Tissue Antigens**, v. 52, p. 81-83, 1998.

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

BUCHS, N. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. **Genes and Immunity**, v. 2, p. 222–228, 2001.

BUJAK, M.; FRANGOIANNIS, N. G. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of heart disease. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v.57, p. 165-176, 2009.

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

CALZADA, J. E. et al. Lack of association between NRAMP1 gene polymorphisms and *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue Antigens**, v. 57, p. 353-357, 2001b.

CALZADA, J. E. et al. No evidence for association of the inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism with *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue Antigens**, v. 59, p. 316-319, 2002.

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.

- CARDOSO, C. A. F. et al. Conversações entre Charles Darwin e Carlos Chagas: a infecção por *Trypanosoma cruzi* sob uma perspectiva ecoevolutiva e pedagógica. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 17, p. 811-825, 2009.
- CARTER, M. J. et al. Association of the interleukin 1 receptor antagonist gene with ulcerative colitis in Northern European Caucasians. **Gut**, v. 48, p. 461-467, 2001.
- CHORLEY, B. N. et al. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. **Mutatin Research**, v. 659, p. 147–157, 2008.
- COBB, D.; HAMBRIGHT, D.; SMELTZ, R. B. T-bet-independent effects of IL-12 family cytokines on regulation of Th17 responses to experimental *T. cruzi* infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, p. 965-971, 2010.
- COLORADO, I. A. et al. HLA Class II DRB1, DQB1, DPB1 polymorphism and cardiomyopathy due to *Trypanosoma cruzi* chronic infection. **Human Immunology**, v. 61, p. 320–325, 2000.
- CORDEIRO, C. A. et al. Interleukin-1 gene polymorphisms and toxoplasmic retinochoroiditis. *Molecular Vision*, v. 14, p. 1845-1849, 2008.
- 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. x, p. xxx-xxx, 2012.
- CRUZ-ROBLES, D. et al. MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease. **Human Immunology**, v. 65, p. 60–65, 2004.
- CRUZ-ROBLES, D. et al. Association between *IL-1B* and *IL-1RN* gene polymorphisms and Chagas' disease development susceptibility. **Immunological Investigations**, v. 38, p. 231-239, 2009.
- CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 479-489, 2010.
- CUNHA-NETO, E. et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 252-258, 2009.
- DAMSKER, J. M.; HANSEN, A. M.; CASPI, R. R. Th1 and Th17 cells adversaries and collaborators. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1183, p. 211–221, 2010.
- DANIS, V. A. et al. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. **Clinical Experimental Immunology**, v. 99, p. 303-310, 1995.

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

DEGHAIDE, N. H. S.; DANTAS, R. O.; DONADI, E. A. HLA class I and II profiles of patients presenting with Chagas' disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 43, p. 246- 252, 1998.

DIAS, J. C. P. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 41-45, 2009.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095-2147, 1996.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519-550, 2009.

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

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

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

ESPINOZA, J. L. et al., A genetic variant in the IL-17 promoter is functionally associated with acute graft-versus-host disease after unrelated boné marrow transplantation, **PLoS ONE**, v. 6, p. e26229, 2011.

FAÉ, K. C. et al. HLA and β -myosin heavy chain do not influence susceptibility to Chagas' disease cardiomyopathy. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 745–751, 2000.

FERNÁNDEZ-MESTRE, M. T. et al. Influence of the HLA Class II polymorphism in chronic Chagas' disease. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 197-203, 1998.

FERNÁNDEZ-MESTRE, M. T. Immunogenetics of Chagas' disease. **Imunología**, v. 21, p. 21-28, 2002.

FERNÁNDEZ-MESTRE, M. T.; MONTAGNANI, S.; LAYRISSE, Z. Is the CCR5-59029-G/C genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease? **Human Immunology**, v. 65, p. 725-8, 2004.

FLÓREZ, 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.

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

GARCÍA-BORRÁS, S. et al. Distribution of HLA-DRB1 alleles in Argentinean patients with Chagas' disease cardiomyopathy. **Immunological Investigations**, v. 38, p. 268-275, 2009.

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

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

GREGERSEN, P. K.; OLSSON, L.M. Recent Advances in the Genetics of Autoimmune Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 363-391, 2009.

GUEDES, P. M. M. et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 4, p. 1-11, 2010.

GUO, S.; COBB, D.; SMELTZ, R. B. T-bet inhibits the in vivo differentiation of parasite-specific CD4⁺ Th17 cells in a T cell-intrinsic manner. **Journal of Immunology**, v. 182, p. 6179-6186, 2009.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1123-1131, 2005.

HIGUCHI, M. L.; GUTIERREZ, P. S. AIELLO, V. D. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchow's Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 423, p. 157-160, 1993.

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

HURME, M.; SANTILLA, S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 2598-2602, 1998.

IWAKURA, et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunological Reviews**, v. 226, p. 57-79, 2008.

KAWAGUCHI, M. et al. IL-17F sequence variant (His161Arg) is associated with protection against asthma and antagonizes wild-type IL-17F activity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.117, p. 795-801, 2006.

KOMATSU, Y. et al. Association of interleukin-1 receptor antagonist +2018 gene polymorphism with Japanese chronic periodontitis patients using a novel genotyping. **International Journal of Immunogenetics**, v. 35, p. 165-170, 2008.

KUBISTOVA, S.; MRAZEK, F., PETREK, M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 153, p. 93–102, 2009.

LANNES-VIEIRA, J. et al. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors – how to make a dream come true. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 226-235, 2009.

LAUCELLA, S. A. et al. Frequency of interferon- γ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. **Journal of Infectious Disease**, v. 189, p. 909-918, 2004.

LAYRISSE, Z. et al. HLA-C*03 is a risk factor for cardiomyopathy in Chagas disease. **Human Immunology**, v. 61, p. 925–929, 2000.

LESCURE, F. X.; et al. Chagas disease: chances in knowledge and management. **Lancet Infectious Disease**, v. 10, p. 556-570, 2010.

LOPES, E. R. et al. Anatomia patológica de corações de chagásicos assintomáticos falecidos de modo violento. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, p. 189-197, 1981.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. IL-17 is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. In: **XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology**, Anais eletrônicos, Foz do Iguaçu, 2011.

MIYAZAKI, Y. et al. IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Immunology**, v. 185, p 1150–1157, 2010.

MOREIRA, P. R. et al. A functional interleukin-1 β gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, p. 306–311, 2005.

MOREIRA, P. R. et al. The *IL1A* (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. **Journal of Periodontal Research**, v. 42, p. 23–30, 2007.

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

O'CONNOR, W. JR. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. **Nature Immunology**, v. 10, p. 603-609, 2009.

ONISHI, R. M.; GAFFEN, S. L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. **Immunology**, v. 129, p. 311–321, 2010.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1069-1070, 2005.

PASCUZZO-LIMA, C.; MENDIBLE, J. C.; BONFANTE-CABARCAS, R. A. Polimorfismo I/D del gen de la enzima de conversión de angiotensina y progresión de la miocardiopatía chagásica. **Revista Española de Cardiología**, v. 62, p. 320-322, 2009.

PENA, S.D.J.et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE**, v. 6, p. e.17063, 2011.

PETERSEN, C. A.; BURLEIGH, B. A. Role for interleukin-1b in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4441-4447, 2003.

PETERSEN, C. A.; KRUMHOLZ, K. A.; BURLEIGH, B. A. toll-like receptor 2 regulates interleukin-1 β -dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 6974–6980, 2005.

PISSETTI, C. W. et al. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 5, p. e976, 2011.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 2379-2387, 2009.

POCIOT, F. et al. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. **European Journal of Clinical Investigations**, v. 22, p. 396-402, 1992.

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

RAMASAWMY, R. et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. **Journal of Infectious Disease**, v. 193, p. 1394-1399, 2006b.

RAMASAWMY, R. et al. Polymorphisms in the gene for lymphotoxin- α predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 196, p. 1836–1843, 2007.

RAMASAWMY, R. et al. Variants in the promoter region of *IKBL/NFKBIL1* gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi*-infected individuals. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 283–288, 2008.

RAMASAWMY, R. et al. Heterozygosity for the variant S180L of the adaptor protein MAL/TIRAP in the TLR-pathway is associated with lower risk of developing chronic Chagas cardiomyopathy. **Journal of Infectious Disease**, v. 199, p. 1838-1845, 2009.

RASSI JR, A.; RASSI, A., MARIN-NETO, J.A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 152-158, 2009.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrate in chronic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor+ cells and dominance of granzyme A+ CD8+ lymphocytes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 637-644, 1993.

ROCHA, M. O.; TEIXEIRA, M. M.; RIBEIRO, A. L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 5, p. 727-743, 2007.

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

ROMAGNANI, S. Human Th17 cells. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, p. 1-8, 2008.

SEIDERER, J. et al. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 14, p. 437-445, 2008.

SMITH, A. J. P.; HUMPHRIES, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 20, p. 43-59, 2009

SOUZA, P. E. A. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5283-5291, 2004.

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

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

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

TORRES, O. A. et al. Lack of association between IL-6 -174G/C gene polymorphism and Chagas disease. **Tissue antigens**, p. 1-4, 2010b.

VICENOVÁ, B. et al. Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases. **Physiological Research**, v. 58, p. 481-498, 2009.

VITELLI-AVELLAR, D. M. Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, p.516-525, 2008.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Science Signaling**, v. 3, 2010.

WITKIN, S. S.; GERBER, S.; LEDGER, W. J. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. **Clinical Infectious Disease**, v. 34, p. 204-209, 2002.

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

ZAFRA, G. et al. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 27-30, 2008.

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



APÊNDICE

APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Apresentação de trabalhos

❖ **IV Simpósio de Biologia Celular (2011) – Apresentação de pôster**

Título: Polimorfismos em genes codificadores da IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra estão associados com o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica.

Autores: HOJO-SOUZA, NS; CORREIA-SILVA, Jeane de Fátima; ROCHA, Manoel Otávio Costa; NUNES, Maria do Carmo Pereira; COSTA, Germano Carneiro; GOLLOB, Kenneth John; DUTRA, Walderez Ornelas.

Trabalho premiado como melhor pôster do IV Simpósio de Biologia Celular.

❖ **XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology (2011) – Apresentação oral e de pôster**

Título: Polymorphisms in genes encoding IL-1 family members are associated with the development of cardiomyopathy in chagas disease.

Autores: HOJO-SOUZA, NS; CORREIA-SILVA, Jeane de Fátima; ROCHA, Manoel Otávio Costa; NUNES, Maria do Carmo Pereira; COSTA, Germano Carneiro; GOLLOB, Kenneth John; DUTRA, Walderez Ornelas.

Trabalho selecionado para apresentação oral.

❖ **II Encontro de Pesquisa em Parasitologia e Simpósio Satélite Dia Darwin Parasitologia em Foco (2011) – Apresentação oral e de pôster**

Título: O polimorfismo de nucleotídeo único no gene IL-17A (-197A>G) está associado com o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica crônica.

Autores: HOJO-SOUZA, NS; CORREIA-SILVA, Jeane de Fátima; ROCHA, Manoel Otávio Costa; NUNES, Maria do Carmo Pereira; COSTA, Germano Carneiro; GOLLOB, Kenneth John; DUTRA, Walderez Ornelas.

Trabalho selecionado para apresentação oral e premiado como melhor apresentação oral na área de Imunoparasitologia.