

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Giovane Rodrigo de Sousa**

**CITOCINAS PLASMÁTICAS COMO  
BIOMARCADORES DE MORBIDADE CARDÍACA  
NA DOENÇA DE CHAGAS**

**Belo Horizonte  
Faculdade de Medicina – UFMG  
2012**

**Giovane Rodrigo de Sousa**

**CITOCINAS PLASMÁTICAS COMO  
BIOMARCADORES DE MORBIDADE CARDÍACA  
NA DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau.

**Belo Horizonte**  
**Faculdade de Medicina – UFMG**  
**2012**

S725c Sousa, Giovane Rodrigo de.  
Citocinas plasmáticas como biomarcadores de morbidade cardíaca na  
Doença de Chagas [manuscrito]. / Giovane Rodrigo de Sousa. - - Belo  
Horizonte: 2012.  
107f.: il.  
Orientador: Manoel Otávio da Costa Rocha.  
Co-Orientadora: Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Medicina.

1. Doença de Chagas. 2. Citocinas. 3. Morbidade. 4. Marcadores  
Biológicos. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Rocha, Manoel Otávio da  
Costa. II. Estanislau, Juliana de Assis Silva Gomes. III. Universidade  
Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.  
NLM: WC 705

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**REITOR:** Prof. Clélio Campolina Diniz

**VICE-REITORA:** Prof<sup>a</sup>. Rocksane de Carvalho Norton

**PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO:** Prof. Ricardo Santiago Gomez

**PRÓ-REITOR DE PESQUISA:** Prof. Renato de Lima dos Santos

### **FACULDADE DE MEDICINA**

**DIRETOR:** Prof. Francisco José Penna

**VICE-DIRETOR:** Prof. Tarcizo Afonso Nunes

#### **COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

#### **SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof<sup>a</sup>. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

#### **CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

Prof. Ricardo de Menezes Macedo

#### **COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.

#### **SUBCOORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

#### **COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr. (Coordenador)

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Subcoordenador)

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof<sup>a</sup>. Denise Utsch Gonçalves

Prof<sup>a</sup>. Mariângela Carneiro

Paula Souza Lage de Carvalho - Representante discente titular



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 34099640 FAX: (31) 34099641



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **GIOVANE RODRIGO DE SOUSA**, registro número 2011659730. No dia dezoito de dezembro de dois mil e doze, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar o trabalho final intitulado: “Citocinas plasmáticas como biomarcadores de morbidade cardíaca na Doença de Chagas”, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha/ orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau/ coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Profa. Silvana Maria Elói Santos	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof. Ricardo Toshio Fujiwara	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2012.

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha [assinatura]  
Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau [assinatura]  
Profa. Silvana Maria Elói Santos [assinatura]  
Prof. Ricardo Toshio Fujiwara [assinatura]  
Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior/Coordenador [assinatura]

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

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr.  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde:  
Infectologia e Medicina Tropical  
Faculdade de Medicina - UFMG



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



### DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos professores doutores Manoel Otávio da Costa Rocha, Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, Ricardo Toshio Fujiwara e Silvana Maria Elói Santos, aprovou a defesa de dissertação intitulada: **“Citocinas plasmáticas como biomarcadores de morbidade cardíaca na Doença de Chagas”** apresentada pelo mestrando **Giovane Rodrigo de Sousa** para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 18 de dezembro de 2012.

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha  
Orientador

Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Prof. Ricardo Toshio Fujiwara

Profa. Silvana Maria Elói Santos

À Rafaella, minha esposa,  
pelo apoio incondicional e irrestrito  
durante este trabalho.  
Obrigado pelo seu amor, carinho e cumplicidade.

Ao pequeno Benício, meu filho,  
por me trazer inspiração  
e amenizar o meu cansaço  
com o seu sorriso casto.

Aos meus pais, Admar e Leníria,  
que não pouparam esforços para me proporcionar  
o melhor acesso à educação  
e cultivaram o trabalho  
como uma das essências da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela onisciente proteção e por iluminar o meu intelecto durante os estudos.

Ao Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha, que, por seu compromisso com a verdade científica e capacidade de despertar e estimular a reflexão, a crítica e curiosidade, tem marcado profundamente a minha vida acadêmica. O meu eterno respeito e gratidão pela permanente orientação deste trabalho e pelos ensinamentos que transcendem o conhecimento científico.

À Prof<sup>a</sup>. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, pelo respeito que me foi dispensado durante todo o estudo, pelo entusiasmo, estímulo, espírito crítico e indispensável apoio durante a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira, por abrir as portas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) e pela oportunidade de desenvolver novas habilidades na área da pesquisa experimental em imunologia e de adquirir novos conhecimentos científicos. Agradeço pelas valiosas sugestões e críticas ao manuscrito produto deste trabalho.

À Rafaelle Fares, que generosamente ensinou-me a técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA) empregada nos ensaios imunológicos.

Ao amigo Marcos Damásio, braço direito durante cada etapa operacional deste trabalho, pelo profícuo convívio.

A Karine Silvestre, Vanessa Valente e Nayara Medeiros, pela amizade, ajuda e boa vontade.

A Ana Thereza Chaves, pela amizade e suporte no levantamento bibliográfico e durante a redação do projeto deste estudo.



Aos pacientes do Ambulatório de Referência em Doença de Chagas, pela confiança, compreensão e cooperação.

A todos os funcionários do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP), pela prazerosa convivência.

Aos funcionários do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do CPqRR, pela disponibilidade e apoio nos bastidores para facilitar a realização dos procedimentos.

À equipe da Plataforma de Citometria de Fluxo do CPqRR, pelo suporte técnico durante a leitura e análise dos experimentos.

Aos meus irmãos, que mesmo à distância acompanham meu desenvolvimento profissional, pelo incentivo e vibração dedicados.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, têm contribuído para minha formação profissional e científica, minha gratidão.

*“Gosto de ficar sozinho, a pensar na vida, neste universo imenso que nos encanta e humilha. De sentir a fragilidade das coisas e a nossa própria insignificância.”*

*Oscar Niemeyer*

## RESUMO

Este estudo foi desenvolvido para determinar se a expressão de marcadores imunológicos em pacientes com diferentes formas da doença de Chagas associa-se a fatores determinantes de morbidade cardíaca nessa doença. Pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi*, com idade variando entre 23 e 69 anos (média de  $45,6 \pm 11,25$ ) foram agrupados como forma indeterminada (IND) e com cardiomiopatia (CARD). O grupo IND incluiu 82 pacientes assintomáticos, com idade entre 24 e 66 anos (média de  $39,6 \pm 10,3$ ), sem alterações significantes ao eletrocardiograma, radiografia do tórax e ao ecocardiograma. O grupo CARD incluiu 94 pacientes, com idade entre 23 e 69 anos (média de  $48 \pm 12,52$ ) com cardiomiopatia dilatada, caracterizada por achados ecocardiográficos de dilatação do ventrículo esquerdo com comprometimento da função ventricular sistólica. Constituíram o grupo-controle (NI) 24 indivíduos saudáveis, com testes sorológicos negativos para infecção pelo *T. cruzi*, provenientes de área não endêmica. Os resultados demonstraram que pacientes IND expressam elevados níveis de interleucina (IL)-10, comparados com indivíduos dos outros grupos. Todavia, a expressão de citocinas inflamatórias, como interferon (IFN)- $\gamma$ , fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , provou ser mais elevada no grupo CARD. Análise de correlação evidenciou que a alta expressão de IL-10 associa-se à melhor função cardíaca, determinada pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo e diâmetro diastólico ventricular esquerdo. Os achados corroboram com o papel da IL-10 na proteção contra o dano cardíaco. Em conjunto, os resultados indicam que o bom equilíbrio entre as citocinas inflamatórias e reguladoras representa elemento-chave no estabelecimento de formas distintas da doença de Chagas. Além disso, este estudo ajudou a lançar luz sobre a complexa rede de citocinas subjacente à imunopatogênese da cardiopatia chagásica crônica.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas. Morbidade. Citocina. Resposta imune.

## ABSTRACT

The present study was designed to determine if the expression of immunological markers in patients with different forms of Chagas disease is associated with determining factors of cardiac morbidity in this disease. Patients infected with *Trypanosoma cruzi* were grouped as indeterminate form (IND) and cardiac (CARD) patients ranging from 23 to 69 years of age (mean of  $45.6 \pm 11.25$ ). The IND group included 82 asymptomatic individuals, ranging from 24 to 66 years of age (mean of  $39.6 \pm 10.3$ ), with no significant alterations in electrocardiography, chest X-ray, and echocardiogram. The CARD group included 94 patients ranging from 23 to 69 years of age (mean of  $48 \pm 12.52$ ) presenting with dilated cardiomyopathy, characterized by the echocardiographic finding of a dilated left ventricle with impaired ventricular systolic function. Healthy individuals, ranging from 29 to 55 years of age (mean of  $42.6 \pm 8.8$ ), from a non-endemic area for Chagas disease and showing negative serological tests for the infection were included as a control group (NI). Data analysis demonstrated that IND patients have a higher intensity of interleukin (IL)-10 expression when compared with individuals in the other groups. By contrast, the forms of inflammatory cytokine expression, such as interferon (IFN)- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ , proved to be the highest in the CARD group. Correlated analysis showed that high IL-10 expression was associated with better cardiac function, as determined by left ventricular ejection fraction and left ventricular diastolic diameter values. The findings support the protective role of IL-10 against cardiac damage in human Chagas disease. Altogether, the results indicate that a fine balance between regulatory and inflammatory cytokines represents a key element in the establishment of distinct forms of chronic Chagas disease. Furthermore, this study helped to shed light on the complex cytokine network underlying the immunopathogenesis of chronic chagasic cardiopathy.

Key words: Chagas disease. Morbidity. Cytokine. Immune response.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APC	Alofocianina
AV	Átrioventricular
AVE	Acidente vascular encefálico
BAV	Bloqueio átrioventricular
BAVT	Bloqueio átrioventricular total
BCRD	Bloqueio completo de ramo direito
BCRE	Bloqueio completo de ramo esquerdo
CARD	Cardiomiopatia dilatada
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CTR-DIP	Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DIP-HC	Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FCI	Forma crônica indeterminada
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL	Fluorescência
FSC	<i>FowardScatter</i>
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HBAE	Hemibloqueio anterior esquerdo
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IND	Indeterminada

IV	Intraventricular
LASER	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LICM	Laboratório de Imunologia Celular e Molecular
LSM	Meio de separação de linfócitos
MIF	Intensidade média de fluorescência
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MW	Mann-Whitney
NBR	Norma brasileira
NI	Indivíduo saudável não infectado
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
°C	Graus centígrados
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salínico
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína clorofila piridinina
rpm	Rotações por minuto
SCA	Sem cardiopatia aparente
SSC	<i>Sidescatter</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
T4	Tiroxina
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF	Fator transformador de crescimento
Th	<i>T-helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VED	Diâmetro diastólico ventricular esquerdo

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras

FIGURA 1 - Ilustração de gráfico <i>box-plot</i> .....	35
FIGURA 2 - Análise de citocinas por citometria de fluxo.....	52

### Quadros

QUADRO 1 - Classificação clínica da cardiomiopatia chagásica.....	42
QUADRO 2 - Descrição das variáveis do estudo, 2012.....	46

## LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Distribuição da população e amostra estimada, 2012.....	45
--	----



# SUMÁRIO<sup>1</sup>

APRESENTAÇÃO.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 Cardiopatia chagásica crônica.....	27
2.2 Ecocardiografia na doença de Chagas.....	30
2.3 Imunopatogenia da doença de Chagas.....	32
2.4 Métodos estatísticos.....	38
2.4.1 Estatística descritiva.....	39
2.4.2 Teste de Kruskal-Wallis.....	40
2.4.3 Teste de Mann-Whitney.....	40
2.4.4 Coeficiente de correlação de Spearman.....	41
3 HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	43
3.1 Hipóteses.....	43
3.2 Objetivo geral.....	43
3.3 Objetivos específicos.....	43
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	45
4.1 Delineamento do estudo.....	45
4.2 Descrição do local.....	45
4.3 Caracterização geral da população estudada.....	46
4.4 Critérios de elegibilidade.....	48
4.4.1 Critérios de inclusão.....	48
4.4.2 Critérios de exclusão.....	49
4.5 Cálculo do tamanho amostral.....	50
4.6 Variáveis estudadas.....	50

---

<sup>1</sup> Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

4.7	Elaboração do banco de dados específico.....	51
4.8	Avaliação clínica.....	52
4.9	Eletrocardiograma.....	52
4.10	Ecocardiograma.....	52
4.11	Separação do plasma do sangue periférico.....	53
4.12	Aquisição e análise dos dados no citômetro de fluxo.....	54
4.13	Avaliação do padrão de citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 e IL-1 $\beta$ em amostras de plasma.....	55
4.14	Análise estatística.....	57
4.15	Considerações éticas.....	58
4.16	Pesquisa bibliográfica.....	59
5	RESULTADOS.....	60
5.1	<i>Article - Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease.....</i>	60
6	CONCLUSÕES.....	83
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
8	PROPOSIÇÕES.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86

## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi estruturado conforme Resolução nº. 01/2011 de 3 de março de 2011, do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da seguinte forma:

### **Parte I**

Introdução

Revisão da Literatura

Objetivos

Metodologia

### **Parte II**

Resultados e Discussão

Artigo: *Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease*

### **Parte III**

Conclusões

Considerações Finais

Referências

Anexos e Apêndices

# 1 INTRODUÇÃO

Em abril de 1909, Carlos Chagas, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, comunicou ao mundo a descoberta de uma nova doença. Ele descreveu o agente etiológico (o protozoário que denominou de *Trypanosoma cruzi* – *T. cruzi*, em homenagem ao mestre Oswaldo Cruz), o vetor (um inseto triatomíneo), o mecanismo básico de transmissão, as manifestações clínicas, os animais reservatórios e os aspectos sociais da nova doença, que carregaria seu nome (CHAGAS, 1909). Considerado um feito único na Medicina, constitui um marco decisivo na história da ciência e da saúde brasileiras. Contribuição inovadora ao campo emergente da Medicina Tropical e dos estudos sobre as doenças parasitárias transmitidas por insetos-vetores, que tornou pública não apenas uma nova entidade nosológica, como também a realidade social e sanitária do interior do Brasil, afligido pelas endemias rurais.

Atualmente, a doença de Chagas ainda persiste como um dos principais problemas médico-sociais na América Latina, devido à sua extensa distribuição e estreita relação com o subdesenvolvimento econômico e social. É uma doença endêmica em 15 países das Américas, embora a migração de pessoas infectadas possa disseminá-la a países não endêmicos da América e do mundo. Estima-se que haja 15 milhões de indivíduos infectados e que outros 28 milhões estejam em risco de se infectarem. Com 41.200 novos casos anuais, a doença de Chagas ainda é responsável por 12.500 mortes a cada ano (MONCAYO; SILVEIRA, 2009). Apesar dos esforços intensivos no sentido de se promover a interrupção das transmissões vetorial e sanguínea da doença de Chagas no país, estima-se que ainda haja 1,3 milhões de infectados (SCHMUNIS, 2007).

Resultados de 94.000 exames sorológicos realizados em uma amostra da população com idade compreendida entre 0-5 anos, em 2007, indicam que a soroprevalência nesta faixa etária é de 0%, o que pode ser interpretado como uma prova da interrupção da transmissão vetorial da doença de Chagas no país (MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

Embora se observe significativa redução da sua incidência em humanos nas últimas décadas, casos agudos ainda têm sido relatados no país (STEINDEL, 2008).

No território nacional, em 2010, foram observados 4.876 óbitos pela doença de Chagas. Aproximadamente 25% desses óbitos ocorreram somente no estado de Minas Gerais, considerado um dos estados brasileiros com mais alta prevalência da endemia chagásica, onde se verificaram 1.256 mortes (DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE - DATASUS, 2010).

Além disso, a doença de Chagas acarreta profundas repercussões de ordem socioeconômica e previdenciária, por incidir, em sua fase crônica, em grupos populacionais em idade mais produtiva. O número de aposentados devido a essa doença, em especial à cardiopatia chagásica crônica, em algumas áreas de alta prevalência, como Minas Gerais, supera o de doenças como a tuberculose, hanseníase ou cegueira por causas diversas, sendo a principal causa de aposentadoria precoce em nosso meio (SCHMUNIS; ZICHER; MONCAYO, 1996; ROCHA, 1994).

A principal de transmissão da doença ao homem é a vetorial, que responde por mais de 70% dos casos em países em que não existe controle sistemático do vetor (COURA; DIAS, 2009). É conhecida a existência de vetores da doença desde o sul dos Estados Unidos à Argentina (VINHAES; DIAS, 2000).

O *T. cruzi* é um flagelado da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, uma organela contendo DNA e localizada na mitocôndria. Em seu ciclo, o *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas, as quais são identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo. No tripomastigota – estágio infectante do parasito – o cinetoplasto situa-se na parte posterior do flagelado, em posição terminal ou subterminal, e o flagelo emerge da bolsa flagelar, de localização próxima ao cinetoplasto; nos epimastigotas – formas de multiplicação do parasita no inseto vetor ou em cultura – o cinetoplasto e a bolsa flagelar estão em posição anterior ao núcleo; por fim, os amastigotas – estágios evolutivos que se multiplicam dentro das células hospedeiras – são organismos arredondados que apresentam inconspícuos flagelos. O inseto se torna infectado após se alimentar do sangue

de animais ou humano infectado com formas tripomastigotas do parasito. Ao ser ingerido pelo triatomíneo, o *T. cruzi* passa por uma sequência irreversível de transformações ao longo do tubo digestivo do inseto. Desse modo, as formas sanguíneas ingeridas transformam-se em formas arredondadas e em epimastigotas; passando pelo intestino médio, processa-se a multiplicação de epimastigotas, que em geral se perpetua por toda a existência do inseto. Finalmente, os epimastigotas atingem o reto, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados com as dejeções do inseto na pele do hospedeiro vertebrado (BRENER, 1973). O ciclo evolutivo do *T. cruzi* no vetor é influenciado por vários fatores, tais como: a espécie do inseto, a linhagem do parasita, inóculo parasitário e fatores ambientais.

Qualquer que seja o mecanismo de transmissão do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado, o tripomastigota tem necessariamente que penetrar uma célula a fim de cumprir o seu ciclo evolutivo. Esse estágio infectante do *T. cruzi* é bastante ubiqüitário e se introduz em uma variedade de células e tecidos: musculatura lisa e estirada, macrófagos, células epiteliais, fibroblastos. Após a penetração na célula hospedeira, o tripomastigota se diferencia em amastigota, que, após período de latência de 20 a 30 horas, inicia o seu processo de divisão binária intracelular, o qual ocorre a cada 12 horas. Uma vez a célula preenchida, os amastigotas se transformam em tripomastigotas. A célula parasitada rompe-se e libera essas formas do parasita que infectam células vizinhas ou caem na corrente circulatória, disseminando-se para penetrar em células de diferentes órgãos e tecidos, repetindo-se nelas o mesmo ciclo. O parasito é capaz de infectar o novo hospedeiro se houver ferida na pele - pela picada do inseto ou de outros cortes ou abrasões ou mesmo através da mucosa dos olhos ou boca. Pode haver a infecção das células subepidérmicas e então entrar na corrente sanguínea e circular, para alcançar outros tecidos corporais (CLAYTON, 2010).

Além da infecção vetorial, outras formas de transmissão podem ser encontradas, como por transmissão congênita, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e em acidentes de laboratório. Alternativamente, pessoas e animais podem se tornar infectados oralmente a partir da ingestão de alimentos e bebidas contaminados com as fezes do vetor triatomíneo contendo o parasito (CLAYTON, 2010). Recentemente, constataram-se surtos da doença de Chagas após a ingestão de bebidas como suco de cana-de-açúcar e açaí contaminados com as

formas tripomastigotas do parasito. Essa contaminação ocorreu, provavelmente, no momento do preparo dos sucos, quando os triatomíneos silvestres infectados foram triturados e/ou suas fezes contaminaram o alimento. Esse evento pode indicar a presença de insetos que albergam o parasito em áreas onde se acreditava já estar controlada a transmissão vetorial (STEINDEL *et al.*, 2008).

A doença de Chagas apresenta duas fases distintas: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por elevada parasitemia, detectada por esfregaço sanguíneo fresco, parasitismo de muitos tipos celulares, principalmente fibras musculares e inflamação (MONCAYO, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Frequentemente a fase aguda não é percebida pelos pacientes, visto que 95% dos casos não exibem manifestações clínicas. Nos casos sintomáticos remanescentes, as manifestações são caracterizadas por: febre; mal-estar; mialgia; sonolência; cólicas e diarreia, além de edema e distúrbios respiratórios. A fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* apresenta curta duração, em geral de seis a oito semanas, que geralmente entra em remissão espontaneamente a qual se segue a fase crônica (MONCAYO, 2003, TEIXEIRA *et al.*, 2006).

A fase crônica é caracterizada por escasso parasitismo tecidual e baixa parasitemia. A doença entra nesta fase, de modo geral, iniciando-se com um longo período de latência clínica o qual se denomina forma indeterminada, com duração de 10 a 30 anos ou ao longo da vida (PRATA, 2001). O diagnóstico é baseado na detecção de anticorpos parasito-específicos por técnicas como *Enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA), imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta (APT, *et al.*, 2008; RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012).

A doença de Chagas pode acometer, virtualmente, qualquer sistema orgânico. No curso da vida, aproximadamente 30% dos indivíduos cronicamente infectados desenvolverão manifestações da forma crônica da doença. Envolvimento visceral digestivo é detectado em quase 6% e distúrbios neurológicos em 3% da população chagásica; contudo, a cardiopatia constitui a mais séria complicação, atingindo, em algum momento de suas vidas, um terço dos indivíduos sorologicamente positivos para *T. cruzi* (MARIN-NETO; SIMÕES; SARABANDA, 1999).

Entre as diferentes formas da doença de Chagas, a cardiomiopatia é a mais expressiva manifestação, devido à sua gravidade, constituindo importante

causa de insuficiência cardíaca no Brasil (MARIN-NETO; SIMÕES; SARABANDA, 1999). Apresenta caracteristicamente curso evolutivo lento e progressivo, apesar de a morte súbita eventualmente constituir sua primeira manifestação. Além disso, pode levar à falência cardíaca, arritmias e bloqueios cardíacos de tipo e gravidade variáveis, fenômenos tromboembólicos (ROCHA; RIBEIRO; TEIXEIRA, 2003; ROCHA; TEIXEIRA; RIBEIRO, 2007).

A forma crônica indeterminada (FCI) é observada na maioria dos pacientes (50-60%), que podem permanecer assintomáticos por períodos de tempo longos e variáveis. O conceito de FCI tem raízes estabelecidas, muito precocemente, na história do conhecimento da doença de Chagas, abrangendo indivíduos aparentemente normais, porém com potencial evolutivo (LARANJA, 1953). A existência de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* sem o quadro clínico da doença de Chagas foi reconhecida, já em 1916, por Carlos Chagas, que a entendera como entidade caracterizada por indivíduos aparentemente normais, mas que se comportavam como “cardíacos potenciais”. A conotação sombria desse termo estigmatizava pacientes jovens e assintomáticos desde aquela época, dificultando seu acesso ao mercado de trabalho e provocando importante problema médico-social. Em 1953, Laranja definiu-a como “forma laboratorial”, abrangendo pacientes infectados que, após fase aguda ou sem ela, permaneceriam assintomáticos, mas com soro marcado por dezenas de anos ou mesmo por toda a vida.

Apesar de algumas controvérsias, consideram-se na forma indeterminada os indivíduos chagásicos assintomáticos, nos quais se requer a explícita demonstração de normalidade eletrocardiográfica, radiológica cardíaca e a exclusão de envolvimento esofágico e intestinal colônico por técnicas radiológicas, sem alterações na avaliação por técnicas mais sensíveis como ecocardiograma, teste ergométrico e eletrocardiografia dinâmica (ROCHA; RIBEIRO; TEIXEIRA, 2003). A grande dificuldade para a caracterização dessa forma é a indicação rotineira do exame radiológico do aparelho digestivo, em paciente chagásico assintomático, o que teria benefício questionável. Como o tratamento das lesões digestivas da doença de Chagas está restrito a formas mais avançadas e sintomáticas, é necessário reavaliar se o possível benefício das informações obtidas com base em estudos radiológicos do trato gastrointestinal superam o desconforto e o custo operacional do exame (RIBEIRO; ROCHA,



1998). Dessa forma, em muitas investigações clínicas, emprega-se a expressão “doença de Chagas sem cardiopatia aparente”, referindo-se aos pacientes com sorologia positiva, eletrocardiograma e radiografia de tórax normais, que não foram submetidos ao estudo radiológico do aparelho digestivo (MARIN-NETO *et al.*, 2002).

Rotineiramente, nas avaliações médico-trabalhistas e médico-periciais, a investigação propedêutica básica restringe-se à realização do exame clínico, eletrocardiograma e estudo radiológico do tórax. Além disso, constitui motivo de embaraço ético a solicitação de enema opaco em pacientes assintomáticos e com escassa possibilidade de benefício com a realização desse exame. Assim, a não ser que se comprove que o diagnóstico de alterações radiológicas digestivas assintomáticas tenha importância na definição do tratamento ou na estratificação de risco de pacientes chagásicos sem cardiopatia aparente, é questionável o valor das informações diagnósticas obtidas pela realização rotineira do estudo contrastado do trato gastrointestinal nesses pacientes (RIBEIRO; ROCHA, 1998).

Embora vários estudos longitudinais tenham demonstrado o bom prognóstico dos pacientes com FCI da doença de Chagas, aproximadamente 2 a 5% deles evoluem anualmente para uma das formas clínicas manifestas da doença (DIAS, 1989). Com cinco a 10 anos de evolução, em torno de um terço dos pacientes na FCI poderão desenvolver cardiopatia (STORINO *et al.*, 1994). A maioria manifesta cardiopatia leve, mas alguns evoluirão para formas mais graves. Além disso, tem sido relatada morte súbita em pacientes com doença de Chagas como primeira manifestação dessa endemia (BESTETTI *et al.*, 1993).

A ecocardiografia representa um dos métodos complementares mais importantes na avaliação dos indivíduos chagásicos. A quantificação do comprometimento miocárdico constitui, atualmente, uma das principais indicações do método, fornecendo dados fundamentais para a orientação terapêutica e prognóstica (ACQUATELLA, 2007; NUNES *et al.*, 2010).

A utilização rotineira do ecocardiograma em pacientes com a forma indeterminada permite detectar precocemente a disfunção miocárdica regional, típica da afecção (ORTIZ *et al.*, 1987). Essas anormalidades da motilidade segmentar das paredes do ventrículo esquerdo, documentadas pela ecocardiografia basal em pacientes chagásicos com função sistólica normal,

parecem ser preditoras de deterioração da função ventricular durante o seguimento desses pacientes (PAZIN-FILHO *et al.*, 2006).

Acredita-se que alterações na fase crônica sejam consequências de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro vertebrado, assim como a fatores socioeconômicos. Entre os fatores relacionados ao parasito, a variabilidade das linhagens, o tropismo, a antigenicidade e o tamanho do inóculo são aspectos relevantes (FRANCO *et al.*, 2003; VAGO *et al.*, 2000). Quanto ao hospedeiro, é importante ressaltar a faixa etária, o sexo e, especialmente, as características imunológicas e genéticas (ARANTES *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2003).

De fato, é bem aceito que a ausência de manifestações clínicas na doença de Chagas está associada à habilidade do indivíduo em controlar a resposta imune desencadeada no controle do parasitismo, o qual pode contribuir para os danos inflamatórios, característicos da enfermidade (BRENER; GAZZINELLI, 1997). Considerando a complexidade da resposta imune, Bahia-Oliveira *et al.* (1998) referiram que o perfil de citocinas produzido pelos pacientes com doença de Chagas pode estar relacionado à gravidade da doença, já que aqueles com FCI apresentam níveis elevados de IL-10, quando comparados com pacientes com cardiomiopatia dilatada (CARD), cuja principal citocina produzida é o interferon (IFN- $\gamma$ ).

Gomes *et al.* (2003), ao estudarem o papel funcional dos leucócitos do sangue periférico de pacientes infectados pelo *T. cruzi* quando estimulados *in vitro* com antígenos do parasito, constataram que a principal fonte de IFN- $\gamma$  são os linfócitos T CD4+, enquanto os monócitos são responsáveis pela produção de elevados níveis de IL-10, favorecendo a regulação da resposta imune e o controle da morbidade da doença.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Cardiopatia chagásica crônica

A cardiopatia crônica constitui a manifestação clínica mais importante da doença de Chagas, constituindo elemento determinante principal da incapacidade laborativa e do prognóstico dos pacientes acometidos por essa enfermidade (BESTETTI; MUCCILLO, 1997; COURA *et al.*, 1985). O expressivo impacto socioeconômico dessa doença deve persistir por décadas, considerando-se o contingente de indivíduos jovens infectados, ainda em formas assintomáticas, com potencial evolutivo da doença (DIAS, 2007).

As evidências clínicas de lesão cardíaca surgem anos ou décadas após a infecção pelo *T. cruzi*. A maioria dos pacientes acometidos pela cardiopatia chagásica encontra-se entre a segunda e a quarta décadas de vida (DIAS; LARANJA; NOBREGA, 1945), observando-se gradativo envelhecimento dessa população, em virtude da eficácia do controle setorial, com virtual eliminação da transmissão domiciliar no Brasil. Dias (1985), em estudo longitudinal, observou que a proporção de pacientes com cardiopatia chagásica cresceu de forma progressiva na segunda (33,8%), terceira (39,3%) e quarta décadas a partir da infecção. A evolução do acometimento cardíaco é heterogênea, podendo manifestar-se de forma silenciosa ou com alguma das três apresentações clínicas: com sinais e sintomas de insuficiência cardíaca, com arritmias complexas e com manifestações cardioembólicas (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; ROCHA; NUNES; RIBEIRO, 2009).

A despeito dos aspetos patogênicos, a cardiopatia chagásica crônica tem como substrato morfológico fundamental a inflamação progressiva e fibrosante do miocárdio (BOGLIOLO, 1976a). De acordo com Tafuri, Lopes e Chapadeiro (1969), o acúmulo progressivo de colágeno intersticial pode ser considerado o principal fator responsável pela piora progressiva da função contrátil do miocárdio na cardiopatia chagásica crônica.

Outros fatores, além da fibrose miocárdica, participam das alterações histopatológicas responsáveis pela miocardiopatia chagásica. Entre eles, as

lesões do sistema nervoso autônomo intrínseco do coração são muito frequentes e encontradas tanto em pacientes com a forma avançada da doença, exibindo alterações do ritmo e insuficiência cardíaca congestiva (TAFURI; LOPES; CHAPADEIRO, 1969), como em indivíduos com doença de Chagas aparentemente assintomáticos e, ainda, em outros que, sem terem apresentado sintomatologia prévia perceptível, tiveram morte súbita (LOPES; CHAPADEIRO, 1983). Achado importante na patogenia da cardiopatia chagásica é a ativação crônica de fatores inflamatórios no miocárdio, que pode ser um dos fatores que implicam pior prognóstico dessa doença em relação às cardiopatias de outras etiologias (MOCELIN *et al.*, 2005).

O acometimento miocárdico na fase crônica da doença de Chagas caracteriza-se por miocardite crônica, fibrose intersticial, degeneração de miócitos e hipertrofia de fibras miocárdicas, com ou sem atrofia focal (ANDRADE, 1958; ANDRADE; ANDRADE, 1955; BOGLIOLO, 1976b; OLIVEIRA *et al.* 1981; RASO; CHAPADEIRO; TAFURI *et al.*, 1985). Frequentemente verificam-se afilamentos focais do miocárdio e presença de aneurismas, especialmente na região apical do ventrículo esquerdo.

Os mecanismos intrínsecos e peculiares a cada paciente e que determinam o padrão evolutivo da cardiopatia chagásica crônica ainda não foram completamente desvendados. Entretanto, há evidências de que o prognóstico dessa cardiopatia dependa da forma de expressão do acometimento miocárdico, sendo fatores que contribuem para o risco de morte a ocorrência de alterações eletrocardiográficas (DIAS; KLOETZEL, 1968; MAGUIRE *et al.* 1987), a disfunção autonômica (JUNQUEIRA JR., 1993) arritmias cardíacas (COURA, 1988; MOTA *et al.*, 1990) e o grau de comprometimento do desempenho ventricular (ACQUATELLA *et al.*, 1987; ESPINOSA *et al.*, 1991; HAGAR; RAHIMTOOLA, 1991).

Algumas complicações de ocorrência frequente em pacientes com doença de Chagas na fase crônica têm sido atribuídas à lesão apical. Esta pode ser responsável pela gênese de arritmias (LAMOURIER *et al.*, 1975) em pacientes chagásicos crônicos ou estar associada a fenômenos tromboembólicos (LARANJA, 1953; NUNES; BARBOSA; ROCHA, 2005; NUNES *et al.*, 2004), além de poder prejudicar o rendimento contrátil ventricular. Estudos prévios analisando a prevalência da lesão apical ao ecocardiograma (NUNES *et al.*, 2004; 2009)

salientaram lesão apical em aproximadamente 45% dos casos, mas sem impacto prognóstico (NUNES *et al.*, 2009). Mais recentemente, Barbosa (2010), em estudo envolvendo 296 pacientes na fase crônica da doença de Chagas, em que se buscou avaliar a possível associação entre a lesão apical e o número e complexidade de extrassistolia ventricular em pacientes com doença de Chagas crônica, observou presença de lesão apical em 69 pacientes (23%), destacando-se 9% dos casos na forma indeterminada/sem cardiopatia aparente. Por outro lado, verificou-se elevada frequência desse tipo de lesão em chagásicos com cardiomiopatia dilatada (56,5% 39/69) quando comparados aos demais grupos de pacientes estudados ( $p < 0,001$ ).

Os fenômenos tromboembólicos são relativamente comuns na cardiopatia chagásica crônica, representando importante causa de incapacidade física e mortalidade. Estudos recentes mostram que os fenômenos tromboembólicos são mais frequentes em pacientes que apresentam trombos intracardíacos situados principalmente nos aneurismas apicais, estando associados à disfunção ventricular esquerda menos pronunciada (NUNES; BARBOSA; ROCHA, 2005). Estudo longitudinal desenvolvido por Nunes, Barbosa e Rocha (2005) demonstrou aneurisma apical em 35 dos 75 pacientes avaliados, com prevalência de trombo apical de 17%. Os fatores associados a acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico prévio foram disfunção sistólica leve do ventrículo esquerdo e trombo apical.

As manifestações clínicas cardíacas resultam das alterações fundamentais (inflamação, lesões celulares e fibrose) que o *T. cruzi* provoca, direta ou indiretamente, no tecido especializado de condução, no miocárdio contrátil e no sistema nervoso autônomo intracardíaco (NUNES; BARBOSA; ROCHA, 2005).

Importante consequência das lesões miocárdicas é a disfunção ventricular. Com a destruição das fibras miocárdicas e sua substituição por tecido fibroso, entram em ação mecanismos de compensação da disfunção ventricular, por meio de hipertrofia das fibras íntegras e dilatação da cavidade ventricular, visando à manutenção do débito cardíaco, da pressão arterial e da perfusão tissular em níveis adequados. Entretanto, com a evolução da miocardite e com a distensão excessiva das fibrocélulas remanescentes, esse processo de compensação vai se tornando inapropriado, surgindo, então, as manifestações clínicas de insuficiência cardíaca (RASSI; RASSI; LITTLE, 2000).

A insuficiência cardíaca inicialmente cursa com predomínio da disfunção ventricular esquerda, exibindo dispnéia e limitação funcional progressiva como principal sintomatologia. À medida que progride, notam-se manifestações biventriculares, algumas vezes com manifestações de disfunção direita dominando a apresentação clínica (HAGAR *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 2003). A disfunção ventricular esquerda constitui processo fisiopatológico de base. Destacadamente, a cardiopatia chagásica cursa com pior prognóstico, quando comparada com cardiopatias de outras etiologias (BARBOSA, 2009; BESTETTI; MUCCILLO, 1997; BRAGA *et al.*, 2008; CAMPOS LOPES *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2010; RINCON *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008).

A estratificação de risco é importante na avaliação terapêutica e prognóstica dos pacientes com cardiopatia chagásica. Os preditores clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos tradicionais perdem seu valor prognóstico independente quando testados em um modelo multivariado que inclua estimativa direta da gravidade do acometimento miocárdico (RASSI; RASSI; RASSI, 2007). O doppler ecocardiograma, por sua capacidade de quantificar, de forma objetiva, a lesão miocárdica, possui amplo potencial para avaliação da morbidade e do prognóstico dos pacientes com doença de Chagas (NUNES *et al.*, 2010).

## 2.2 Ecocardiografia na doença de Chagas

Na doença de Chagas, aspecto desafiador da complexa patogênese da cardiopatia crônica, consiste na identificação dos mecanismos determinantes da progressão da miocardite crônica focal de baixa intensidade, identificável na forma indeterminada, para o dano miocárdico extenso e progressivo da forma crônica cardíaca (BOGLIOLO, 1976a; MARIN-NETO *et al.*, 2007).

A ecocardiografia representa um dos métodos complementares mais importantes na avaliação dos indivíduos chagásicos. A determinação da gravidade do comprometimento cardíaco representa, atualmente, uma das principais indicações do método, fornecendo dados fundamentais para a orientação terapêutica e prognóstica (ACQUATELLA *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2010). Recentemente, novas técnicas ecocardiográficas, como o doppler tecidual, *strain*, *strain rate* e o ecocardiograma tridimensional, foram introduzidas,

permitindo abordagem morfofuncional cardíaca de forma mais acurada e reprodutível (NUNES *et al.*, 2010).

A função sistólica ventricular esquerda mensurada pela fração de ejeção permanece como forte marcador prognóstico na doença de Chagas, independentemente do estágio clínico do paciente (NUNES *et al.*, 2008; 2009; 2010; RASSI; RASSI; RASSI, 2007; ROCHA; NUNES; RIBEIRO, 2009). Dessa forma, o mais consistente e independente preditor de risco na cardiopatia chagásica é a disfunção ventricular esquerda, que se traduz em acentuado aumento da mortalidade tanto por progressão da insuficiência cardíaca, quanto por morte súbita e por acidente vascular cerebral (NUNES *et al.*, 2010; RASSI; RASSI; LITTLE, 2006; RASSI; RASSI; RASSI, 2007; RODRIGUEZ-SALAS *et al.*, 1998; SAMUEL *et al.*, 1983; VIOTTI *et al.*, 2005).

A alteração segmentar da contratilidade miocárdica representa um dos aspectos mais interessantes relacionados ao acometimento cardíaco na doença de Chagas. A detecção de alteração segmentar identifica os indivíduos chagásicos que podem evoluir com piora progressiva da função sistólica ventricular esquerda (PAZIN-FILHO *et al.*, 2007).

Até recentemente, a abordagem da cardiopatia chagásica restringia-se à análise da função sistólica do ventrículo esquerdo. Entretanto, as anormalidades da função diastólica exercem importante papel na fisiopatologia da insuficiência cardíaca secundária à doença de Chagas (OLIVEIRA *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2010). Lima *et al.* (2010) demonstraram que parâmetros de disfunção diastólica foram os determinantes da capacidade funcional em pacientes com miocardiopatia chagásica, independentemente da função sistólica.

Estudos prévios registraram anormalidade precoce do relaxamento ventricular esquerdo em pacientes chagásicos (BARROS *et al.*, 2001; CAEIRO *et al.*, 1985; MARTINEZ FILHO *et al.*, 1986). O acúmulo de fibras do colágeno intersticial na cardiopatia chagásica crônica pode, inicialmente, determinar alterações no relaxamento ventricular e, progressivamente, reduzir a complacência miocárdica e causar aumento da pressão atrial esquerda. A disfunção diastólica causa estiramento dos miócitos, levando ao remodelamento ventricular e intensa ativação neuro-hormonal (BARBOSA *et al.*, 2007). Esses fatores contribuem para a evolução desfavorável da cardiopatia. Assim, a

disfunção diastólica é um importante marcador de gravidade da doença (NUNES *et al.*, 2009; 2010).

Vários estudos avaliaram com mais acuidade as pressões de enchimento do ventrículo esquerdo com o emprego do doppler tecidual. Recentemente, a relação entre a onda E do fluxo mitral (E) e a onda protodiastólica do anel mitral ao doppler tecidual (e') foi proposta e validada como um índice das pressões de enchimento do ventrículo esquerdo (OMMEN *et al.*, 2000). Empregando o doppler tecidual, Barros *et al.* (2004) caracterizaram os diversos padrões de enchimento ventricular na doença de Chagas e verificaram correlação entre pressões de enchimento elevadas e disfunção sistólica na quase totalidade dos pacientes acompanhados. Posteriormente, Nunes *et al.* (2010) realçaram que a elevação da relação E/e' correlacionou-se com tradicionais índices de disfunção diastólica, constituindo ainda melhor preditor prognóstico em pacientes com miocardiopatia chagásica. Isso se deve ao fato de a relação E/e' constituir-se em um marcador mais acurado das pressões de enchimento, também com valor prognóstico estabelecido em outras doenças cardíacas (WANG *et al.*, 2003).

Por fim, o ecocardiograma permite quantificar a lesão miocárdica com grande potencial para avaliação da morbidade e do prognóstico dos pacientes com doença de Chagas. Dessa forma, esse método complementar permite melhor estratificação de risco, com impacto no manejo clínico da cardiopatia chagásica (NUNES *et al.*, 2010).

### **2.3 Imunopatogenia da doença de Chagas**

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da doença são, ainda, pouco compreendidos. A análise de particularidades na patogênese das diferentes formas clínicas sugere que múltiplos fatores possam estar envolvidos no seu estabelecimento. As reações inflamatórias, observadas tanto durante a fase aguda quanto crônica da infecção, parecem ter importante papel no desenvolvimento da enfermidade. Nos tecidos afetados, ocorre produção local de vários mediadores imunológicos, causando intensa migração de leucócitos durante a interação entre o parasito e as células do hospedeiro (CHANDRASEKAR *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 1997). O prolongado período de



latência e a escassez no número de parasitos, contrapostos à intensidade e à extensão das lesões, são fatores que têm levado diversos autores a propor o envolvimento de fatores autoimunes na patogênese da lesão chagásica. Alguns identificam, ainda, a existência de reação cruzada entre componentes autólogos e antígenos do *T. cruzi* (ACOSTA; SANTOS-BUCH, 1985; AL-SABBAGH *et al.*, 1998; CUNHA-NETO *et al.*, 1995; KALIL; CUNHA-NETO, 1996; KIERSZENBAUM, 1986; 1999; LEVITUS *et al.*, 1991; VAN VOORHIS; EISEN, 1989; WOOD *et al.*, 1982). Desta forma, é bem aceito que respostas antiparasito (ABEL *et al.*, 1997) e autorreatividade (COSSIO *et al.*, 1976; LEVITUS *et al.*, 1991) não se excluem mutuamente e que a combinação dos tipos de resposta imune poderia estar envolvida no estabelecimento da doença chagásica (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005).

Nesse contexto, o sistema imune do hospedeiro é fundamental para o controle da parasitemia, mas, por outro lado, pode contribuir para a progressão da cardiopatia chagásica (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005; REIS, 2011). Interessantemente, o parasito está presente em pacientes assintomáticos e naqueles com a forma cardíaca da doença de Chagas (BOCCHI *et al.*, 1996; ELIAS *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 1993; ZHANG; TARLETON, 1999). A persistência do parasito depende da combinação de fatores, incluindo liberação de moléculas que interferem na resposta imune. Por outro lado, tem sido demonstrado que o *T. cruzi* é capaz de suprimir a ativação de linfócitos, reduzindo sua habilidade de resposta contra antígenos do parasito (MARTIN *et al.*, 2006). Desta forma, a manutenção do parasito em tecidos do hospedeiro seria resultado de estratégias evasivas utilizadas pelo *T. cruzi*. Um provável mecanismo de evasão do sistema imune é devido à exibição diferencial de epitopos antigênicos por células infectadas (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). Souza *et al.* (2007) relataram a capacidade do *T. cruzi* em induzir a expressão diferencial de moléculas coestimuladoras por monócitos nas diferentes formas da doença de Chagas. Esses autores descreveram que pacientes com forma indeterminada possuem características moduladoras como baixa expressão da molécula HLA-DR e alta expressão de interleucina 10 (IL-10), enquanto monócitos derivados de pacientes do grupo CARD parecem estar comprometidos com intensa resposta inflamatória devido à alta expressão de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (SOUZA *et al.*, 2004).

Outros estudos mostraram, ainda, que pacientes com a forma indeterminada apresentam frequência aumentada de células (*Natural Killer*) NK, sugerindo possível papel protetor dessa população celular. A capacidade citotóxica dessas células pode então contribuir para o controle do parasitismo tecidual nesses pacientes e evitar a resposta deletéria relatada em pacientes com a forma cardíaca (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005).

Embora diversos trabalhos utilizando modelos experimentais tenham definido a importância das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como de células NK, macrófagos e células B na infecção pelo *T. cruzi* (ARAUJO, 1989; BRENER; GAZZINELLI, 1997; HONTEBERYTIE-JOSKOWICZ *et al.*, 1987; HONTEBERYTIE-JOSKOWICZ, 1991; LAGUENS *et al.*, 1981; ROTTENBERG *et al.*, 1988, 1993; SANTOS *et al.*, 1992; SOARES; SANTOS, 1999; TARLETON *et al.*, 1990; 1992), esses parâmetros não estão totalmente esclarecidos na infecção humana.

A avaliação das populações celulares envolvidas na infecção mostrou que células B CD5<sup>+</sup> estão presentes em alto percentual na circulação de pacientes com doença de Chagas, sugerindo uma relação entre esses fenótipos celulares e o desenvolvimento de autoimunidade nessa doença (DUTRA *et al.*, 1994). É importante salientar que essa população de linfócitos é capaz de produzir autoanticorpos relacionados a alguns processos autoimunes no homem (HARDY *et al.*, 1994; HARDY; HAYAKAWA, 1986).

Outro estudo que empregou uma estratégia alternativa para caracterizar o perfil global de células, tanto da imunidade inata como da adaptativa, correlacionando esses perfis com formas distintas da cardiopatia chagásica crônica, sugere que linfócitos T CD4<sup>+</sup> constituem as principais populações celulares envolvidas no perfil regulatório em pacientes com forma indeterminada. Por outro lado, verificou-se que monócitos e linfócitos T CD4<sup>+</sup> também determinam o perfil inflamatório em indivíduos com cardiomiopatia (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2008).

A importância das células T na doença chagásica está apoiada tanto nos achados que demonstram a sua resposta *in vitro* como nos dados que evidenciam a presença dessas células no infiltrado inflamatório verificado no miocárdio de pacientes com cardiomiopatia chagásica. O infiltrado cardíaco de pacientes com a forma cardíaca apresenta razão de 2:1 de células T CD8<sup>+</sup> em relação às células T

CD4<sup>+</sup>, sugerindo o papel da citotoxicidade no dano miocárdico (HIGUCHI *et al.*, 1993). Vitteli-Avelar *et al.* (2006) observaram que linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes com a forma indeterminada possuem elevado potencial migratório, o que é importante no controle do parasitismo tecidual. Além disso, esses pacientes exibem frequência de células T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> mais alta do que indivíduos não chagásicos e os com a forma cardíaca (VITTELI-AVELAR *et al.*, 2006). Contudo, também apresentam mais atividade de células da imunidade inata (VITTELI-AVELAR *et al.*, 2006). Observou-se, ainda, que casos de cardiomiopatia exibem mais frequência de células T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> se comparados a indivíduos não chagásicos (VITTELI-AVELAR *et al.*, 2006). Além disso, pacientes na fase crônica da doença de Chagas têm percentual aumentado de células T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (DUTRA *et al.*, 1996). Estudos revelam que a expressão de CD28 está relacionada à função citotóxica exacerbada (AZUMA; PHILLIPS; LANIER, 1993). Posteriormente, Menezes *et al.* (2004) identificaram correlação negativa entre a produção de citocinas inflamatórias e a frequência de células T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> em pacientes com cardiomiopatia.

O fato de antígenos do parasito e anticorpos antiparasito estarem presentes no hospedeiro durante a fase crônica da infecção sugere o envolvimento de elementos parasitários em mecanismos distintos de ativação celular e, provavelmente, no desenvolvimento da enfermidade chagásica (DUTRA *et al.*, 2000). Os sinais coestimuladores, representados por diferentes moléculas presentes na superfície dos linfócitos e das células apresentadoras de antígenos, são componentes essenciais para a ativação das células T. Entre os sinais coestimuladores, destaca-se a ligação entre CD28/CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2), que constitui um dos eventos mais importantes no fenômeno de estimulação linfocitária. Linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> provenientes do sangue periférico de pacientes com a doença de Chagas exibem mais frequência de células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> e CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> quando comparados aos de indivíduos não chagásicos (DUTRA *et al.*, 1996). Considerando-se a importância do CD28 para a ativação das células T, essa observação pode significar que diferentes etapas de ativação dos linfócitos ou eventos imunorreguladores distintos estejam ocorrendo no curso da infecção chagásica.

Em estudos envolvendo fragmentos de miocárdio de pacientes com doença de Chagas observou-se apoptose em células T CD4<sup>+</sup> e macrófagos inflamatórios.

A análise dos dados estabelece que a apoptose é um mecanismo de perda celular na miocardiopatia chagásica (HIGUCHI *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2008). No entanto, seu papel de morte celular programada no controle ou desenvolvimento da cardiopatia chagásica carece de mais investigações.

Os mecanismos utilizados na regulação da resposta imune em diferentes infecções ainda não estão totalmente esclarecidos. Entretanto, tem-se observado a participação de células T reguladoras exercendo papel protetor durante a infecção. As células T coexpressando CD4 e altos níveis da molécula CD25 foram descritas como sendo células caracterizadas como anérgicas em resposta a estímulos policlonais, com elevada capacidade de suprimir a produção de citocinas e a proliferação celular a partir do contato célula-célula, sendo denominadas células T reguladoras (Treg) (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001).

São bastante claras as evidências de que pacientes com a forma indeterminada apresentam percentuais elevados de células Treg quando comparados àqueles com cardiomiopatia e indivíduos não chagásicos (ARAUJO *et al.*, 2007; 2011; VITTELLI-AVELAR *et al.*, 2005), sugerindo que essas células poderiam controlar as funções efetoras dos linfócitos T induzidas pelo *T. cruzi*. A expansão de células Treg pode ser benéfica durante a fase crônica da doença, provavelmente, por limitar o dano aos tecidos do hospedeiro, conduzindo a persistência da apresentação clínica de indivíduos na forma indeterminada ao longo da vida. Apesar de muitos estudos em vários modelos, o mecanismo pelo qual células Treg naturais limitam as respostas efetoras permanece pouco entendido, persistindo uma oposição aparentemente não resolvida entre os mecanismos pelos quais essas células suprimem a atividade das células T efetoras *in vitro* e *in vivo* (MARTINS *et al.*, 2004).

As citocinas desempenham importante papel na regulação da resposta imune e seguramente estão envolvidas tanto na resistência quanto em mecanismos relacionados ao desenvolvimento de enfermidade na doença de Chagas (VITELLI AVELAR *et al.*, 2008). Vários estudos têm detectado associação entre IFN- $\gamma$  e a resistência do hospedeiro à infecção experimental pelo *T. cruzi* (CARDILLO *et al.*, 1996; HOLSCHER *et al.*, 1998; MCCABE *et al.*, 1988; MCCABE; MEAGHER; MULLINS, 1991; MUÑOZ-FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; FRESNO, 1992; NABORS; TARLETON, 1991; REED, 1988; SILVA *et al.*, 1995; TORRICO *et al.*, 1991; VESPA; CUNHA; SILVA, 1994), na qual essa citocina

ativa macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO) que, por sua vez, inibe a replicação intracelular do parasito (GAZZINELLI *et al.*, 1992; REED, 1988; VESPA; CUNHA; SILVA, 1994). Por outro lado, a IL-10 é capaz de reduzir a ativação induzida por IFN- $\gamma$ , inibindo tanto a liberação de NO quanto a diferenciação de células T-*helper* (Th1) (ABRAHAMSOHN; COFFMAN 1996; REED *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1992).

Em pacientes com cardiomiopatia chagásica observa-se alta frequência de células T CD4<sup>+</sup> e de T CD8<sup>+</sup> efectoras, secretoras de altos níveis das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e diminuição de células com perfil regulador e baixa produção de IL-10 (CUNHA-NETO *et al.*, 2009, GOMES *et al.*, 2003; 2005; ARAUJO *et al.*, 2007). Por outro lado, os pacientes com forma indeterminada, além de apresentarem células ativadas produzindo citocinas inflamatórias, possuem também elevação no número de células com atividade reguladora e alta produção de citocinas fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ) e IL-0 (ARAUJO *et al.*, 2007; CUNHA-NETO *et al.*, 2009, GOMES, *et al.*, 2003; 2005).

Demonstrou-se que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com cardiomiopatia e forma indeterminada possuem perfis distintos de secreção de citocinas em resposta a antígenos do *T. cruzi* (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*; 1998; GOMES *et al.*, 2003; 2005). Estudos sobre a relação da produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 em grupos de pacientes com diferentes graus de acometimento cardíaco têm se mostrado de grande valor na elucidação de possíveis mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento de tais doenças. Em pacientes com cardiomiopatia foi constatada relação direta entre alto grau de acometimento cardíaco e produção de IFN- $\gamma$  evidenciada após a estimulação de PBMC por antígenos de *T. cruzi*. No entanto, em pacientes com forma indeterminada foram descritos reduzidos valores na razão entre IFN- $\gamma$  e IL-10 quando comparados aos demais grupos de pacientes (GOMES *et al.*, 2003). Outros trabalhos também relataram expressão diferencial de citocinas inflamatórias em lesões cardíacas, especialmente TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (HIGUCHI *et al.*, 1993; REIS *et al.*, 1993).

Estudos desenvolvidos por outros grupos tanto em humanos (REIS *et al.*, 1997; ABEL *et al.*, 2001; VITELLI-AVELAR, 2008) como em modelos experimentais (SOARES *et al.*, 2001, dos SANTOS, 2001) corroboram esses achados. Inferiu-se, ainda que, a maioria das células produtoras de IFN- $\gamma$  eram

linfócitos T CD4<sup>+</sup>, enquanto as fontes de IL-10 eram mais frequentemente monócitos CD14<sup>+</sup> e linfócitos T CD4<sup>+</sup> (GOMES *et al.*, 2003). Esses dados preconizam que a produção de IL-10 por essas células pode estar associada à proteção do hospedeiro contra o desenvolvimento de danos teciduais, induzidos pelo aumento da resposta imune específica do tipo 1.

Outro aspecto importante na imunopatogenia da cardiopatia chagásica diz respeito à participação da IL-1. Postula-se, a partir de estudos em modelos experimentais, que essa citocina seja mediador primário da hipertrofia de cardiomiócitos induzida pela infecção por *T. cruzi* (PETERSEN; BURLEIGH, 2003; PETERSEN *et al.*, 2005).

Com base nos aspectos imunológicos, a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* pode ser caracterizada pelo balanço entre o acúmulo de eficiente resposta imune (inata e adaptativa) e a presença de poucos parasitos no tecido do hospedeiro. Esse balanço pode levar a longo período assintomático da doença, mas em significativa porção dos pacientes, por razões desconhecidas, ocorre distúrbio nessa regulação, favorecendo o aparecimento das manifestações clínicas graves da doença na fase crônica (JONES *et al.*, 1993)

Portanto, é possível especular que o desenvolvimento de lesões cardíacas na doença de Chagas é, em parte, consequência de longa e complexa relação entre persistência do parasito e mecanismos homeostáticos mal-adaptados do hospedeiro, levando a alterações patogênicas (PÉREZ-FUENTES *et al.*, 2003).

## **2.4 Métodos estatísticos**

Nesta seção será realizada uma breve revisão de alguns métodos estatísticos não paramétricos empregados para comparar as medianas de grupos em situações cuja distribuição tem comportamento não normal.

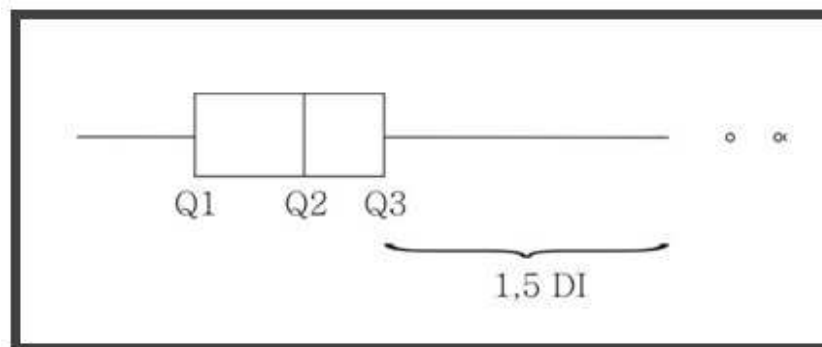
Os métodos estatísticos são essenciais no estudo em que as variáveis estão inerentemente sujeitas a flutuações aleatórias. A estatística é uma forma de pensar nas soluções de problemas práticos e, se usada adequadamente, pode prestar valiosa ajuda no processo de desenvolvimento de conhecimentos. É, portanto, ferramenta útil para orientar a tomada de decisões (SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011).

### 2.4.1 Estatística descritiva

O primeiro passo da análise estatística é a organização da informação para que se possa extrair dos dados algumas estatísticas descritivas (médias, medianas, amplitudes, variância, entre outras) que evidenciem as características dos mesmos. Uma maneira de explorar variáveis qualitativas é pela distribuição de frequência (SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011).

Para variáveis quantitativas, uma ferramenta interessante para explorar as informações contidas nos dados são os gráficos. Destaca-se o gráfico denominado “*Box-plot*”, ou gráfico de caixa, que informa sobre a variabilidade da variável estudada. Dessa forma, ressaltam-se os valores mais e os menos frequentes. Outra característica importante desse gráfico é o auxílio na identificação de possíveis pontos ou valores discrepantes (“*out-liers*”), além da informação sobre a forma da distribuição da variável. Sua aplicação é fortemente recomendável quando se tem interesse na comparação de grupos. Esse gráfico é construído com base em cinco medidas de posição. O primeiro quartil (Q1), a mediana e o terceiro quartil (Q3) menor e maior valor. Os pontos fora da caixa e à distância superior a  $1,5 \times Q1-Q3$  - a distância interquartílica - são denominados “*out-liers*”. A FIG. 1 ilustra esse gráfico (PAGANO; GAUVREAU, 2004; SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011).

FIGURA 1 - Ilustração de gráfico *box-plot*



Fonte: Pagano e Gauvreau (2004).

### 2.4.2 Teste de Kruskal-Wallis

O teste de Kruskal-Wallis, análise simples de variância por postos – em homenagem a William Kruskal e Allen W. Wallis –, é um método não paramétrico para testar se amostras possuem mesma distribuição. É utilizado para a comparação entre mais de duas amostras independentes ou não relacionadas. A hipótese nula factual é de que as populações das quais as amostras originam têm a mesma mediana. Quando o teste de Kruskal-Wallis conduz a resultados significativos, então pelo menos uma das amostras é diferente das outras (CORDER; DALE, 2009). O teste não identifica onde as diferenças ocorrem ou o quanto elas de fato acontecem. É uma extensão do teste de Mann-Whitney para teste de três ou mais grupos (SPURRIER *et al.*, 2003). O teste de Mann-Whitney ajuda a analisar os pares de amostras específicas para diferenças significativas (CORDER; DALE, 2009).

Uma vez que é um método não paramétrico, o teste de Kruskal-Wallis não assume normalidade de distribuição. No entanto, supõe distribuição idêntica em forma e em escala para cada grupo, exceto para qualquer diferença nas medianas. Esse teste é muito útil quando os grupos analisados são de tamanho desigual, ou seja, com diferentes números de sujeitos em cada grupo (SPURRIER *et al.*, 2003).

### 2.4.3 Teste de Mann-Whitney

O teste de Mann-Whitney, também chamado de Mann-Whitney-Wilcoxon ou simplesmente teste de postos de Wilcoxon, é não paramétrico de hipótese estatística para a comparação de medianas de dois grupos independentes. Ele determina se uma de duas amostras de observações independentes tende a ter valores mais altos do que o outro (CORDER *et al.*, 2009). É um dos mais conhecidos testes não paramétricos de significância. Foi proposto inicialmente pelo alemão Gustav Deuchler, em 1914, e posteriormente, de forma independente, por Frank Wilcoxon, em 1945, para tamanhos de amostras iguais. Foi estendido para tamanhos de amostra arbitrárias e de outras formas por



Henrique Mann e seu aluno Donald Ransom Whitney, em 1947 (KRUSKAL, 1957).

Para sua construção, primeiramente obtêm-se os postos de todas as observações como se elas fossem uma única amostra. Para a tomada de decisão, o valor da estatística MW deve ser comparado com o percentil de uma distribuição específica para o teste de Mann-Whitney (SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011).

#### 2.4.4 Coeficiente de correlação de Spearman

Charles Edward Spearman, psicólogo inglês, nascido na Inglaterra em 1846, serviu como oficial do exército britânico, mas se demitiu para cursar doutorado em Psicologia experimental. Spearman foi intensamente influenciado por Francis Galton, considerado o pai da Psicometria, que desenvolveu o conceito de correlação, a principal ferramenta estatística usada por Spearman (SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011). Foi considerado pioneiro da técnica estatística de análise fatorial e desenvolveu o coeficiente de correlação baseado em postos (SPEARMAN, 1904). Spearman faleceu na Inglaterra a 7 de setembro de 1945 aos quase completos 82 anos.

O coeficiente de correlação de Pearson é sensível a pontos atípicos (*outliers*) e, portanto, em algumas situações, há necessidade de medida mais robusta. Quando os dados não formam uma nuvem comportada, com alguns *outliers*, ou se existir relação crescente ou decrescente, mas não linear, o coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman é mais apropriado. Os métodos não paramétricos não fazem suposições sobre o tipo de distribuição dos dados. Os cálculos baseiam-se na ordem, isto é, postos, em inglês, *ranks* dos dados. O coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) ou simplesmente ( $r$ ) é a versão não paramétrica do coeficiente de correlação de Pearson. Também varia entre -1 e 1 e sua interpretação é a mesma do coeficiente de correlação de Pearson (SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011). É importante ressaltar que, alguns erros são comuns na interpretação de resultados que envolvem correlação. Dentre estes, cumpri-se destacar a inferência de que a correlação implica causalidade. Outra fonte de erro potencial é quando os dados se baseiam em taxas ou médias.

Nesta situação, suprime-se a variação entre os indivíduos ou elementos, e isto pode levar a um coeficiente de correlação inflacionado. Finalmente, a conclusão de inexistência de correlação significativa não quer dizer que as variáveis analisadas não estejam relacionadas de alguma forma (TRIOLA, 2011).

Concluída a revisão, questiona-se se a expressão fenotípica da resposta imunológica está associada à morbidade cardíaca na doença de Chagas. Os estudos propostos neste trabalho buscaram melhor entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica. Assim, propôs-se a verificar a possível associação entre a expressão fenotípica da resposta imunológica e o grau de morbidade em pacientes com formas polares crônicas da doença de Chagas.

## **3 HIPÓTESES E OBJETIVOS**

### **3.1 Hipóteses**

- Existe associação entre o desenvolvimento e gravidade do acometimento cardíaco na doença de Chagas e o perfil da resposta imune expresso pela produção de citocinas inflamatórias e moduladoras;
- Existe associação entre o perfil de citocinas plasmáticas e variáveis marcadoras de morbidade cardíaca como: diâmetro diastólico ventricular e fração de ejeção ventricular esquerdo;
- A regulação imunológica em pacientes com FCI é um dos fatores associados ao controle do desenvolvimento da miocardiopatia chagásica;
- A baixa expressão de mecanismos imunológicos regulatórios, na forma CCC5, é um dos fatores associados a maior morbidade nesse grupo;
- O balanço da resposta imunológica constitui fator determinante de morbidade na doença de Chagas.

### **3.2 Objetivo geral**

Verificar a possível associação entre a expressão fenotípica da resposta imunológica e o grau de morbidade em pacientes com formas polares crônicas da doença de Chagas.

### **3.3 Objetivos específicos**

- Avaliar os níveis de citocinas (IL-10, IFN-  $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) no plasma de pacientes com diferentes formas da doença de Chagas.
- Verificar a possível associação entre o perfil da resposta imune, expressa pelos níveis relativos de produção de citocinas plasmáticas (IL-10, IFN-  $\gamma$ ,

TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e a morbidade cardíaca, caracterizada pelas formas polares: FCI e CCC5.

- Verificar a relação entre os níveis de citocinas plasmáticas e variáveis marcadoras de morbidade cardíaca como: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e fração de ejeção ventricular esquerdo.

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento do estudo**

O presente estudo consiste em análise agregada de estudos transversais realizados no período de 1994 a 2011. Trata-se de pesquisa observacional, analítica, com corte transversal. As amostras de plasmas dos pacientes colhidas a partir de sangue periférico em cada estudo, armazenadas por criopreservação (-70°C) foram selecionadas e preparadas para dosagem dos níveis de citocinas conforme protocolo de ensaio imunológico que será descrito adiante. Os dados foram armazenados em um banco de dados único e específico.

### **4.2 Descrição do local**

O recrutamento de pacientes e estudos primários foi feito no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP) "Orestes Diniz", onde funciona o Ambulatório de Referência em Doença de Chagas do Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da UFMG (DIP-HC-UFMG) pelo seu coordenador, o pesquisador médico Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha.

O ambulatório de doença de Chagas foi transformado em centro de referência de atendimento ao paciente chagásico em Minas Gerais em 1991, recebendo indivíduos encaminhados por serviços de hemoterapia e postos de saúde de Minas Gerais. Até o momento, equipe formada por docentes da Faculdade de Medicina da UFMG, médicos-residentes e alunos de pós-graduação já atendeu a mais de 2.500 pacientes chagásicos ou indivíduos encaminhados para esclarecimento de sorologia, clínica ou epidemiologia sugestiva de infecção chagásica.

### **4.3 Caracterização geral da população estudada**

Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram voluntários identificados nos serviços de atenção e cuidado ao paciente portador da doença de Chagas. Todos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICES A e B). O cuidado clínico foi oferecido independentemente da aceitação ou não de participar do estudo.

Os pacientes incluídos neste estudo vêm sendo atendidos no ambulatório desde 1994. A partir de então, na medida em que eles comparecem às consultas médicas rotineiras, realizam-se anotações de cada caso em fichas individuais, incluindo identificação completa, estado sorológico para doença de Chagas, manifestações clínicas, exames complementares e classificação clínica da doença. Pela análise dessas fichas foram selecionados os pacientes, chagásicos ou não, na faixa de 18 a 65 anos, que preencheram os critérios de inclusão e exclusão nos diferentes estudos.

Na rotina de avaliação do comprometimento clínico e subclínico de comprometimento cardíaco, os pacientes foram submetidos aos exames complementares de eletrocardiografia convencional, ecodopplercardiografia, teste ergométrico e eletrocardiografia dinâmica (holter). Todas as avaliações clínicas solicitadas foram procedidas nas dependências do Hospital das Clínicas da UFMG.

Para definição de cardiomiopatia dilatada, adotou-se a classificação habitual no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas descrita no QUADRO 1 (ROCHA; RIBEIRO; TEIXEIRA, 2003):

QUADRO 1 - Classificação clínica da cardiomiopatia chagásica

<b>Grupo clínico</b>	<b>Caracterização</b>
FCI	Assintomático, sem alterações significantes ao exame físico, ECG, radiografia de tórax, esofagograma e enema baritado. Sem alterações na avaliação por técnicas mais sensíveis (ecocardiograma, teste ergométrico e holter).
CCC1	Assintomático, sem alterações significantes ao exame físico, ECG, radiografia de tórax, esofagograma e enema baritado. Técnicas sensíveis são capazes de detectar anormalidades cardíacas de gravidade variável: holter (extrassistolia complexa, extrassistolia isolada frequente, bloqueios AV e IV intermitentes); teste ergométrico (extrassistolia ventricular esforço induzida, queda na pressão arterial); ECG (aneurisma, disfunção diastólica, hipocontratilidade segmentar ou global, aumento das cavidades).
CCC2	Pacientes sem manifestação de insuficiência cardíaca ou em classe funcional II de NYHA e sem aumento da silhueta cardíaca. Podem ter distúrbios de condução avançados, como BCDR, e algumas extrassístoles ventriculares.
CCC3	Pacientes sem manifestação de insuficiência cardíaca ou em classe funcional II de NYHA e sem aumento da silhueta cardíaca. Podem ter distúrbios de condução avançados, como BCRD associado ou não a HBAE, BCRE, BAV 2 Mobitz tipo II e BAVT, além de ondas Q anormais, ondas T simétricas difusamente negativas e extrassistolia ventricular leve a moderada. Os transtornos de condução de estímulo dominam a apresentação clínica.
CCC4	Como no grupo anterior, pacientes não mostram sinais de aumento cardíaco. Porém, os desse grupo exibem extrassístoles ventriculares frequentes, complexas, que dominam a apresentação clínica.
CCC5	Pacientes com sinais clínicos radiológicos e, principalmente, ecocardiográficos de aumento cardíaco, com disfunção da contratilidade ventricular global, com ou sem manifestações de insuficiência cardíaca.

AV: átrio-ventricular; BAV: Bloqueio átrio-ventricular; BAVT: Bloqueio átrio-ventricular total; BCRD: Bloqueio completo de ramo direito; BCRE: Bloqueio completo de ramo esquerdo; HBAE: Hemibloqueio anterior esquerdo; IV: Intraventricular; NYHA: *New York Heart Association*  
 Fonte: Rocha, Ribeiro e Teixeira (2003).

Foram considerados chagásicos os indivíduos com positividade sorológica para *T. cruzi* em duas ou mais técnicas diferentes, incluindo as reações de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta e ELISA, em exames realizados no Laboratório Central do HC-UFMG ou no Laboratório da Fundação Ezequiel Dias. Foram considerados não chagásicos indivíduos sem positividade em qualquer uma das reações sorológicas.

#### **4.4 Critérios de elegibilidade**

##### **4.4.1 Critérios de inclusão**

Os diferentes estudos tinham em comum os critérios de inclusão a seguir:

- Diagnóstico sorológico de infecção por *T. cruzi*, confirmado por dois métodos diferentes (ELISA, imunofluorescência indireta ou hemaglutinação indireta) (BRASIL, 2005).
- Idade entre 18 e 65 anos.
- Pacientes chagásicos com forma indeterminada definidos como: indivíduos assintomáticos, sem disfagia ou constipação intestinal, com eletrocardiograma, radiografia do tórax e ecocardiograma normais.
- Pacientes com CCC5, definidos como: indivíduos com sinais clínicos, radiológicos e, principalmente, ecocardiográficos de aumento da área cardíaca, com disfunção da contratilidade global, com ou sem manifestações de insuficiência cardíaca.
- Indivíduos saudáveis não chagásicos definidos como: sujeitos que apresentam sorologia negativa para *T. cruzi* em qualquer uma das reações sorológicas: IFI, hemaglutinação indireta, ELISA e que não apresentam qualquer um dos critérios de exclusão, com características demográficas semelhantes às dos pacientes chagásicos.
- Consentimento, voluntário e por escrito, para participação dos estudos realizados após esclarecimento de suas finalidades.



#### 4.4.2 Critérios de exclusão

Todos os estudos tinham em comum os critérios de exclusão a seguir:

- Hipertensão arterial sistêmica (HAS), definida operacionalmente como: pressão arterial - medida durante o exame físico - de 140/90 mmHg, em mais de uma oportunidade.
- História compatível com doença arterial coronariana, conforme anamnese dirigida.
- Disfunção tireoidiana manifestada por níveis anormais de hormônio estimulante da tireoide (TSH) e da tiroxina (T4) livre, associados ou não a quadro clínico sugestivo de hiper ou hipotireoidismo.
- Diabetes *mellitus* ou tolerância reduzida à glicose, conforme anamnese, dosagem de glicemia em jejum e, se necessário, prova de tolerância oral à glicose (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).
- Episódio prévio sugestivo de doença reumática aguda.
- Doença pulmonar obstrutiva crônica, evidenciada pela história clínica, exame físico, ECG e alterações radiológicas sugestivas.
- Alcoolismo, definido como consumo médio semanal acima de 420 g de etanol - média diária acima de 60 g de etanol (SKINNER *et al.*, 1984).
- Uso de drogas anti-inflamatórias.
- Evidências clínicas, eletrocardiográficas e/ou ergométricas de cardiopatia isquêmica.
- Gravidez definida por critérios laboratoriais.
- Qualquer outra doença cardiológica ou sistêmica significativa, crônica ou aguda que pudesse interferir nos resultados das provas específicas.
- Anemia significativa, definida arbitrariamente com hemoglobina abaixo de 10 g/dL.
- Distúrbios hidroeletrólíticos, mais especificamente níveis séricos anormais de potássio e sódio.
- Insuficiência renal definida pelo aumento dos níveis de creatinina e uréia plasmáticas, associadas ou não às manifestações clássicas de uremia.

Além disso, para a comparação de variáveis imunológicas e ecocardiográficas em pacientes chagásicos com FCI e CCC5, foram excluídos os

que não tinham o ecocardiograma dentro do intervalo de um ano da data em que foi coletada a amostra de plasma do sangue periférico.

A partir dos critérios expostos, foram selecionados os pacientes chagásicos e indivíduos saudáveis não chagásicos que constituíram as amostras utilizadas nos diversos estudos.

#### 4.5 Cálculo do tamanho amostral

A população deste estudo foi composta de 390 pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas do CTR-DIP - Faculdade de Medicina da UFMG. Eles foram distribuídos da seguinte forma: 100 pacientes com FCI, 250 com CCC5 e 40 indivíduos saudáveis não chagásicos - que constituíram o grupo-controle. Foi utilizada amostra aleatória estratificada de 150 pacientes com margem de erro de  $\pm 6,1\%$ , distribuída conforme a TAB. 1.

TABELA 1 - Distribuição da população e amostra estimada, 2012

<b>Grupo</b>	<b>População</b>	<b>Amostra</b>
Controle	40	15
FCI	100	39
CCC5	250	96
<b>TOTAL</b>	<b>390</b>	<b>150</b>

#### 4.6 Variáveis estudadas

No QUADRO 2 é apresentada a natureza das variáveis estudadas. Elas foram analisadas nos grupos de pacientes com doenças de Chagas, FCI e CCC5. No grupo-controle, foram estudadas todas as variáveis descritas nesse mesmo quadro, com exceção das ecocardiográficas: fração de ejeção do ventrículo esquerdo e diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo. O fato de elas não terem sido analisadas nos indivíduos não chagásicos saudáveis pode constituir-se, potencialmente, em uma limitação do estudo.

QUADRO 2 - Descrição das variáveis do estudo, 2012

Variável	Categoria	Descrição/Escala
Idade	Contínua	Anos
Sexo	Categórica	Masculino, feminino
Classificação clínica	Categórica	NI, FCI e CCC5
Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Teichholz)	Contínua	Percentual
Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo	Contínua	Milímetros
IL-10	Contínua	MIF
IFN- $\gamma$	Contínua	MIF
TNF- $\alpha$	Contínua	MIF
IL-6	Contínua	MIF
IL-1 $\beta$	Contínua	MIF

\* MIF: Intensidade Média de Fluorescência.

#### 4.7 Elaboração do banco de dados específico

Foi elaborado um banco de dados específico a partir dos resultados dos ensaios imunológicos para dosagens de citocinas nos plasmas armazenados pelo Grupo de Pesquisa em Doença de Chagas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Osvaldo Cruz (CPqRR/FIOCRUZ). Associaram-se esses resultados às variáveis clínicas e ecocardiográficas da linha de pesquisa, fatores determinantes de prognóstico e morbidade na cardiopatia chagásica crônica, sob a coordenação do Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.

A partir desse banco de dados único e específico foi realizado o estudo da associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas.

#### **4.8 Avaliação clínica**

Realizou-se ao longo dos anos avaliação criteriosa de todos os pacientes a partir de anamnese e exame físico, dando-se ênfase à ausculta cardíaca, com duração de dois minutos para detecção de extrassistolia em repouso, à caracterização do *ictus cordis* e à pesquisa de sinais de congestão periférica e visceral. Os pacientes foram classificados de acordo com a classe funcional da *New York Heart Association* (1979) e com a classificação clínica de cardiomiopatia, adotada no Ambulatório de Referência em Doença de Chagas (ROCHA; RIBEIRO; TEIXEIRA, 2003).

#### **4.9 Eletrocardiograma**

Para exame do eletrocardiograma em repouso empregou-se aparelho do modelo *PAGE WRITER* 300 P1, fabricante PHILIPS. Realizou-se o exame nas 12 derivações habituais, analisando-se o ritmo e calculando-se a frequência cardíaca. Foram medidos os intervalos PR, onda P, complexo QRS e determinado o eixo cardíaco. Analisaram-se rotineiramente as alterações morfológicas do traçado eletrocardiográfico, com especial caracterização dos distúrbios de condução do estímulo elétrico intraventricular. Utilizou-se código de Minnesota modificado para a doença de Chagas (MAGUIRE *et al.*, 1982), para interpretação do eletrocardiograma.

#### **4.10 Ecocardiografia**

Todos os pacientes foram submetidos à avaliação ecocardiográfica, realizada segundo a rotina do Serviço de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital das Clínicas da UFMG.

Os estudos ecocardiográficos foram realizados por ecocardiografistas experientes no exame de pacientes chagásicos, utilizando o aparelho ATL PHILIPS HDI 5000, com transdutores de 2,5 e 3,0 MHz para obtenção dos diversos parâmetros avaliados, descritos a seguir. Os estudos ao modo M foram

guiados pela imagem bidimensional para obtenção das dimensões diastólica e sistólica finais do ventrículo esquerdo e diâmetros do átrio esquerdo e aorta. Todas as medidas foram feitas conforme as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (SAHN *et al.*, 1978). Ao ecocardiograma bidimensional foram obtidos cortes padronizados, paraesternal, longitudinal e transverso, além dos cortes apicais em duas, três, quatro e cinco câmaras. Foram feitos cortes intermediários, quando necessário, para avaliação da região apical do ventrículo esquerdo. Foram descritas a morfologia das câmaras cardíacas, textura miocárdica, contratilidade das paredes e possíveis achados de trombos e aneurisma. A contratilidade segmentar foi avaliada por meio do espessamento endocárdico e motilidade das paredes, definindo-se as alterações conforme a observação de hipocinesia, acinesia, discinesia ou aneurisma.

As variáveis ecocardiográficas estabelecidas para correlação clínica e funcional cardiocirculatórias foram as seguintes: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e função sistólica ventricular esquerda a partir do cálculo da fração de ejeção. Utilizou-se a definição de acometimento cardíaco dada pelo diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo superior a 55 mm (BAKER *et al.*, 1984) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo igual ou inferior a 55%. A descrição das variáveis estudadas pode ser observada no QUADRO 2.

#### **4.11 Separação do plasma do sangue periférico**

O sangue dos pacientes que participaram dos estudos foi coletado em tubo vacutainer estéril contendo heparina. O sangue total heparinizado foi lentamente adicionado a uma mistura de Ficoll-hypaque (LMS, *Litton Bionetics*, Savannah, Georgia, USA), na proporção de 2:1 em tubos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 400 g durante 40 minutos a 20°C em centrífuga refrigerada Beckman, modelo J-6B (*Beckman Instruments Inc.*, Irvine, USA). Ao final da centrifugação obteve-se um anel de PBMC, o meio de separação de linfócitos (LSM) e o plasma. A metodologia utilizada nesse procedimento foi adaptada dos protocolos originais descritos por Picker *et al.* (1995) e Suni, Picker e Maino (1998), em que alíquotas de 200 µL de sangue são transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon, BD – Estados Unidos da América – EUA).

O plasma foi retirado cuidadosamente e transferido para um tubo Falcon, BD de 5 mL. Posteriormente, foi alicotado e armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  em *freezer* do grupo de estudos em doenças de Chagas do LICM do CPqRR/FIOCRUZ. Toda a manipulação foi feita em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar (BBL - *Biological Cabinet*, model 60474, Cockeysville, MD ou Veco, modelo VLFS 12M, Campinas, SP) com soluções e vidrarias também estéreis.

A unidade de criopreservação do CPqRR/FIOCRUZ possui *freezer* com sistema de alarmes sonoros sensíveis à variações de temperaturas e com *nobreake* que sofre manutenções preventivas periódicas de acordo com cronograma específico, atendendo às recomendações do fabricante. Além disso, existe o sistema de ronda metódica à unidade realizada por profissionais capacitados e treinados permanentemente pelo setor de qualidade do CPqRR/FIOCRUZ para a execução do monitoramento e controle da temperatura de espécimes clínicos armazenados por técnica de criopreservação segundo procedimento operacional padronizado na instituição.

#### **4.12 Aquisição e análise dos dados no citômetro de fluxo**

O citômetro de fluxo que foi utilizado neste trabalho (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, São José, CA, USA, BD) é equipado com *Light amplification by stimulated emission of radiation* (LASER) de 488 nm capaz de detectar e distinguir emissões fluorescentes entre 530 e 650 nm. Além disso, permite a avaliação básica dos seguintes parâmetros: dispersão frontal relativo a tamanho (*Foward Scatter* - FSC) e lateral relativo a granulosidade (*Side Scatter* - SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2) e fluorescência do tipo 3 (FL3). FL1, FL2 e FL3 correspondem, respectivamente, a sinais luminosos emitidos pela excitação de isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e proteína clorofila piridinina (PerCP).

#### 4.13 Avaliação do padrão de citocinas IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ em amostras de plasma

As citocinas foram quantificadas utilizando-se o sistema citofluorométrico com microesferas fluorescentes (*Cytometric Bead Array-CBA*, *Becton Dickinson-BD*), que emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas. Essa metodologia (CHEN *et al.*, 1999) permite a avaliação simultânea de diversas moléculas solúveis no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Não foi necessário diluir as amostras para a leitura no citômetro de fluxo.

Para a reação, 25  $\mu$ L da mistura de esferas de captura, marcadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina estudada, foram transferidos para tubos de 12x75 mm destinados ao controle negativo e às amostras a serem testadas. Em seguida, 25  $\mu$ L do diluente G e das amostras a serem testadas foram adicionados aos seus respectivos tubos. Posteriormente, foram adicionados 18  $\mu$ L do coquetel de anticorpos monoclonais humanos marcados com PE (*Human Inflammation PE Detection Reagent*). Os tubos foram incubados por três horas, à temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500  $\mu$ L da solução tampão fosfato salínico (PBS) e centrifugadas a 1.300 rotações por minuto (rpm) por sete minutos a 18°C. Cuidadosamente o sobrenadante foi aspirado e descartado, restando-se aproximadamente 100  $\mu$ L em cada tubo. As amostras foram encaminhadas para leitura no citômetro de fluxo.

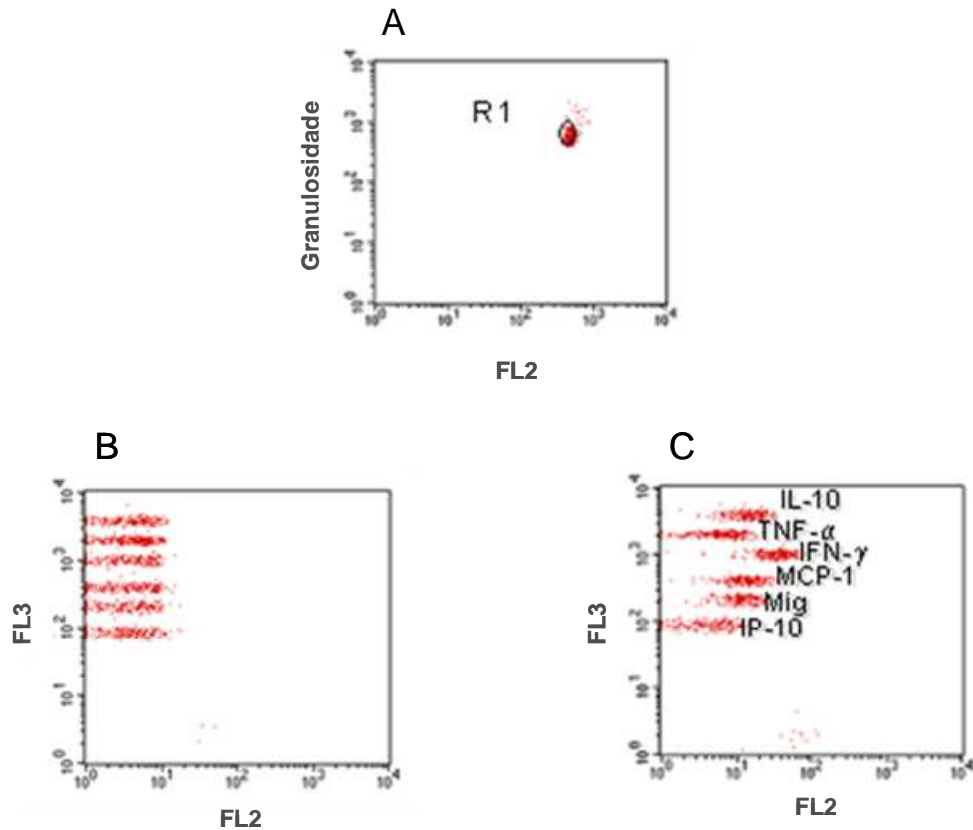
Para aquisição dos dados das amostras, o aparelho foi ajustado utilizando-se o BD *FACSComp Software* e o BD *Calibrate Beads*. O objetivo do ajuste do aparelho consistiu em definir os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) adequados para o posicionamento das esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulosidade. Após a seleção das esferas, procedeu-se ao ajuste da intensidade da FL3, para permitir a segregação das esferas policromáticas, apresentando diferentes intensidades de fluorescência, em histogramas unidimensionais. Para cada tubo processado foram adquiridos 1.800

eventos na região selecionada R1, que equivale a 300 eventos por citocina testada.

Após leitura, foi analisado o perfil de citocinas seguindo-se o protocolo proposto pelo fabricante por meio da utilização do BD CBA *Analysis Software* com o auxílio do *Microsoft Excel*, modificado como descrito a seguir. O programa BD CBA *Analysis Software* faz a seleção automática da região das esferas de captura em gráficos de dispersão frontal (tamanho) *versus* dispersão lateral (granulosidade). Em seguida, separa as esferas em função da intensidade da FL3 e analisa o deslocamento das esferas em função da intensidade da FL2 em gráficos bidimensionais de FL2 *versus* FL3. A ligação da citocina presente na amostra de interesse à esfera de captura e a revelação da ligação a partir do uso de um coquetel de anticorpos monoclonais anticitocinas humanas marcadas com PE podem ser evidenciadas pelo deslocamento do conjunto de esferas para a região de mais intensidade de FL em relação ao tubo-controle negativo, sem plasma humano (FIG. 2). Os valores correspondentes à intensidade média de fluorescência FL2 na escala logarítmica foram utilizados como a unidade de análise semiquantitativa para cada citocina avaliada e os valores expressos em intensidade média de fluorescência (MIF).



FIGURA 2 – Análise de citocinas por citometria de fluxo



Representação dos gráficos de distribuição pontual obtidos a partir da leitura das amostras no citômetro de fluxo FACScan. Primeiramente, as esferas são selecionadas em gráficos de granulosidade versus FL2 (A). Após a seleção das esferas, as mesmas são separadas em função da intensidade da FL3 (B). A análise é feita a partir do deslocamento das esferas em função da intensidade da fluorescência 2 (FL2) em gráficos bidimensionais de FL2 versus FL3 (C). O gráfico B representa uma amostra negativa e o gráfico C representa uma amostra positiva.

#### 4.14 Análise estatística

Pacientes infectados pelo *T. cruzi* foram agrupados como: forma indeterminada (IND) e cardiomiopatia dilatada (CARD). Indivíduos saudáveis constituíram o grupo controle indivíduos saudáveis não infectados (NI), provenientes de área não endêmica para doença de Chagas exibindo testes sorológicos negativos para a doença. As comparações entre os grupos – NI, IND e CARD – foram feitas por meio do teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-

teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni ( $5\% \div 3$ ). Para verificar a relação entre os dados imunológicos e as variáveis marcadoras de morbidade cardíaca chagásica, foram calculados coeficientes de correlação de Spearman. A análise de regressão verificou a influência dos marcadores imunológicos nos fatores determinantes de morbidade nessa doença. As análises estatísticas e os gráficos foram elaborados utilizando-se o *software R* 2.15.0. Todos os testes foram realizados no nível de 5% significância ( $\alpha=0,05$ ).

#### **4.15 Considerações éticas**

O projeto contou com a anuência de todas as instâncias institucionais da Faculdade de Medicina da UFMG, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG em 16 de novembro de 2011, conforme parecer ETHIC nº 502/11 (ANEXO A), cujo registro no COEP é CAAE – 0502.0.203.000-11 (disponível em: [http://portal2.saude.gov.br/sisnep/Projetos\\_Aprovados.cfm?uf=MG&inicio=01/01/2011&fim=01/01/2012](http://portal2.saude.gov.br/sisnep/Projetos_Aprovados.cfm?uf=MG&inicio=01/01/2011&fim=01/01/2012)).

O projeto também foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR/FIOCRUZ e aprovado conforme protocolo CEP – CPqRR nº. 15/2011 (ANEXO B).

Todos os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa de forma voluntária e, após esclarecimento, quanto ao objetivo e métodos do estudo. Os procedimentos foram precedidos da garantia da clara compreensão do conteúdo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e da sua assinatura em duplicata pelos sujeitos da pesquisa. Após assinado, uma via do TCLE foi entregue para cada um deles e uma via ficou em poder do pesquisador responsável (APÊNDICES A e B).

Foram respeitadas as condições éticas pertinentes ao protocolo, seguidos rigorosamente os princípios enunciados na Declaração de Helsink II, de 1975, revisada em 1983, e do Ministério da Saúde do Brasil/Comitê Nacional Brasileiro de Ética em Pesquisa e da Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde para pesquisa em seres humanos.

#### 4.16 Pesquisa bibliográfica

As pesquisas bibliográficas foram realizadas a partir de consulta à base de dados *Medline*, compilada pela *National Library of Medicine*, dos Estados Unidos da América e da *Lilacs*, disponíveis na Internet. Utilizaram-se os seguintes descritores: doença de Chagas, morbidade, citocinas e resposta imune. Foram utilizados filtros tais como: artigos indexados na área de interesse, em português, espanhol e inglês, no período dos diversos estudos aqui relatados. Outras referências complementares de interesse foram obtidas em teses e livros especializados.

A elaboração das referências seguiu as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para elaboração de trabalhos acadêmicos (Norma Brasileira - NBR 14724) (ABNT, 2011). Para as citações e lista de referências, adotaram-se as normas da mesma instituição, sendo elas, respectivamente, NBR 10520 e NBR 6023 (ABNT, 2002), que usam o sistema de citação autor-data e, por essa razão, as referências foram organizadas em ordem alfabética. Para o artigo, adotou-se o formato Vancouver.

## 5 RESULTADOS

### **5.1 Article - *Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease***

Giovane Rodrigo de Sousa<sup>1</sup>, Juliana Assis Silva Gomes<sup>1,2\*</sup>, Rafaelle Chistine Gomes Fares<sup>3</sup>, Marcos Paulo de Souza Damasio<sup>2</sup>, Ana Thereza Chaves<sup>3</sup>, Karine Silvestre Ferreira<sup>2</sup>, Vanessa Alves Azevedo Valente<sup>2</sup>, Nayara Ingrid Medeiros<sup>3</sup>, Maria do Carmo Pereira Nunes<sup>1</sup>, Rodrigo Corrêa-Oliveira<sup>3,4</sup>, Manoel Otávio da Costa Rocha<sup>1</sup>

**1** Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; **2** Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; **3** Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; **4** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais INCT-DT.

**Financial support:** FAPEMIG, CNPq, UFMG and FIOCRUZ.

**Competing Interests:** The authors hereby declare that no competing interests exist regarding this study.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, induces multiple responses in the heart. This disease remains a serious public health problem and affects about 10 million people in Latin America. The present study was designed to determine if the expression of immunological markers in patients with different forms of Chagas disease is associated with determining factors of cardiac morbidity. Patients infected with *T. cruzi* were grouped as indeterminate form (IND) and cardiac (CARD) ranging from 23 to 69 years of age (mean of  $45.6 \pm 11.25$ ). The IND group included 82 asymptomatic individuals, ranging from 24 to 66 years of age (mean of  $39.6 \pm 10.3$ ), with no significant alterations in electrocardiography, chest X-ray, and echocardiogram. The CARD group included 94 patients ranging from 23 to 69 years of age (mean of  $48 \pm 12.52$ ) presenting with dilated cardiomyopathy, characterized by the echocardiographic finding of a dilated left ventricle with impaired ventricular systolic function. Healthy individuals, ranging from 29 to 55 years of age (mean of  $42.6 \pm 8.8$ ), from a non-endemic area for Chagas disease and showing negative serological tests for the infection were included as a control group (NI). Data analysis demonstrated that IND patients have a higher intensity of interleukin 10 (IL-10) expression when compared with individuals in the other groups. By contrast, the forms of inflammatory cytokine expression, such as interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), and interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), proved to be the highest in the CARD group. Correlated analysis showed that high IL-10 expression was associated with better cardiac function, as determined by left ventricular ejection fraction and left ventricular diastolic diameter values. Altogether, these findings indicate that a fine balance between regulatory and inflammatory cytokines represents a key element in the establishment of distinct forms of chronic Chagas disease.

Key words: Chagas disease. Morbidity. Cytokine. Immune response.

## INTRODUCTION

Chagas disease is endemic in Central and South America, where an estimated 10 million patients are infected and another 100-120 million people are at risk of contracting the disease [1]. Moreover, Chagas disease frequently affects patients in their most productive working years, and treatment is quite costly. Therefore, this disease represents a series of important economic consequences within the region [2]. A wide clinical spectrum can be observed in the chronic phase of Chagas disease. Chronic cardiomyopathy is most important and severe manifestation of human Chagas disease, affecting approximately 20-30% of those in the chronic phase of the disease and causing heart failure, arrhythmias, heart-blocks, thromboembolism, stroke, and sudden death. However, approximately 60% of affected individuals present the indeterminate form of the disease, with an apparent absence of morbidity [3,4]. The main cardiac pathological finding in Chagas disease patients is chronic, progressive, and fibrosing myocarditis [5-9]. The architectural changes lead to malfunctioning of the electrophysiological syncytium, causing heart failure and ventricular arrhythmias that result in poor prognoses and high premature mortality rates [10,11].

The mechanisms involved in the development of severe forms of Chagas disease are not well-understood. A plethora of data has demonstrated that the host's immune response plays a key role in the differential clinical evolution of Chagas disease. While the balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines produced by circulating cells in patients with indeterminate form leans towards the anti-inflammatory form, chagasic cardiomyopathy patients display a predominance in the inflammatory environment [12-17].

Inflammatory cytokines are produced during the chronic phase of Chagas disease. Mononuclear cells increase their cytokine production, leading to increased plasma levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , and are even detected in patients with indeterminate form (IND) of Chagas disease [18-22] which most likely occurs in response to the continued presence of parasites. The subset of patients that develop chagasic cardiomyopathy (CARD) displays an array of immunological alterations that are consistent with an exacerbated Th1 immune response. The predominance of the Th1 cells observed in the peripheral blood is reflected by the nature of the inflammatory infiltrate found in the myocardium of CARD patients

[7,18]. Moreover, mononuclear cells infiltrating the CARD myocardium express IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6, with lower levels of IL-2, IL-4, and IL-10 [15,18,23]. Prior literature has been demonstrated that monocytes from both IND and CARD are able to produce IL-10. Furthermore, monocytes from IND patients produce higher levels of IL-10 than do monocytes from CARD [12,14,16]. However, CARD patients do show increased numbers of IFN- $\gamma$ -producing and CD8<sup>+</sup> T cells, with reduced numbers of IL-10-producing and FOXP3<sup>+</sup>-regulatory T cells [13,14,18,19,24-26] as compared to IND patients. These findings emphasize that the cytokine balance represents a key element in the establishment of distinct forms of chronic Chagas disease.

The present study sought to more effectively clarify the immunopathogenesis of chronic chagasic cardiopathy by verifying the expression of immunological markers in patients with different forms of Chagas disease and their possible association with determining factors of cardiac morbidity.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study population**

This study employed a cross-sectional design involving patients from endemic areas within the state of Minas Gerais, Brazil, under the medical care of one of authors of this study (MOCR). The patients who agreed to participate in this study were volunteers identified and selected at the Referral Outpatient Center for Chagas Disease at the Clinical Hospital at the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil. Positive serology for Chagas disease was determined by two or more tests (indirect immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA], or indirect hemagglutination). Patients who agreed to participate in this study signed a written informed consent and were subjected to a standard screening protocol that included medical history, physical examination, electrocardiogram (EKG), laboratory and chest X-ray examinations, and echodopplercardiography evolution. The patients were not undergoing chemotherapy treatment, nor had they been previously treated for *Trypanosoma cruzi* infection.

Individuals with any other chronic inflammatory diseases, thyroid dysfunction, valvular heart disease, coronary artery disease, systemic arterial hypertension, chronic obstructive pulmonary disease, hydroelectrolytic disorders, renal insufficiency, diabetes mellitus, alcoholism, and other infectious diseases were excluded from this study. A total of 176 patients with positive specific serology for *T. cruzi*, within the chronic phase of the disease and with well-defined clinical classification, were enrolled in this study. In addition, 24 healthy individuals were also included in this study within the control group. Detailed evaluations, including physical examinations, electrocardiogram, chest X-rays, and echocardiogram were performed to classify patients in different groups, as previously defined by the authors of this work<sup>3</sup>. Patients infected with *T. cruzi* were grouped as indeterminate (IND) and cardiomyopathy (CARD) patients ranging from 23 to 69 years of age (mean of  $45.6 \pm 11.25$ ). The IND group included 82 asymptomatic individuals, ranging from 24 to 66 years of age (mean of  $39.6 \pm 10.3$ ), with no significant alterations in electrocardiography, chest X-ray, and echocardiogram. The CARD group included 94 patients ranging from 23 to 69 years of age (mean of  $48 \pm 12.52$ ) presenting with dilated cardiomyopathy, characterized by the echocardiographic finding of a dilated left ventricle with impaired ventricular systolic function. Left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular diastolic diameter (LVDD) were used as clinical parameters of the ventricular function for Chagas disease patients, where  $LVEF < 55\%$  and  $LVDD/body\ surface\ area \geq 31mm$  were used to defining Chagas dilated cardiomyopathy<sup>4</sup>. Healthy individuals, ranging from 29 to 55 years of age (mean of  $42.6 \pm 8.8$ ), from a non-endemic area for Chagas disease and showing negative serological tests for the infection were included as a control group (noninfected [NI]).

### **Ethics statement**

Informed written consent was obtained from all individuals prior to their inclusion in the study. Treatment and clinical care were offered to all patients, as needed, regardless of whether or not they actually enrolled in this research project. This study was carried out in full accordance with all international and Brazilian accepted guidelines and was approved by the Ethics Committee at René



Rachou Research Center – FIOCRUZ (14/2006 CEPESH-IRR) and UFMG under protocol COEP-ETHIC 502/11).

### **Blood samples**

A 5-ml sample of peripheral blood by venipuncture was collected from each subject using ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant. The samples were collected by a trained nurse in the Referral Center for Chagas Disease, Minas Gerais, Brazil. After the collection, the whole peripheral blood was analyzed by flow cytometry.

### **Detection of cytokine levels in plasma by means of Cytometric Bead Array (CBA)**

A CBA immunoassay kit - Human Th1/Th2/Th17 and Human Inflammatory Cytokine Kits - (BD Biosciences, USA) was used to measure the cytokines, as recommended by the manufacturer and described previously [27]. Data were acquired in a FACScan flow cytometer equipped with a laser detection system (Becton Dickinson), and the analyses were performed using BD CBA software (Becton Dickinson). The results were expressed by mean intensity of fluorescence (MIF).

### **Statistical analyses**

Comparisons were performed, in groups of two, with the NI, IND, and CARD groups, using the non-parametric Kruskal-Wallis test. The Mann-Whitney test, together with the Bonferroni correction (significance level =  $0.05/3 = 0.0167$ ), was used to investigate the relationship among immunological and clinical data. Immunological markers of Chagas disease variables referent to cardiac morbidity were calculated by means of Spearman correlation coefficients.

Regression analysis was used to determine how immunological markers influenced morbidity factors within this disease. Statistical analyses were performed and graphs formulated using the R 2.15.0 software. All tests were performed considering a significance level of 5% ( $\alpha=0.05$ ).

## RESULTS

### Plasma cytokine levels and their association with cardiac morbidity expressed by the clinical classification of Chagas disease

The expression of different cytokines (IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) were evaluated in the plasma from healthy individuals and patients with different forms of Chagas disease. The three groups were compared, in groups of two, as regards their cytokine expressions. The hypothesis of equality between the groups was discarded. Differences among the three groups could be observed for all evaluated cytokines ( $P < 0.0001$ ), with the exception of IL-1 $\beta$ .

Data analysis showed that the IND group presented a significantly higher presence of IL-10, median of 22.91 (8.98–42.49), as compared to the CARD group, median of 9.93 (2.31–25.58) and the NI group, median of 5.26 (3.19–8.77) ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 1A). By contrast, patients from the CARD group, as compared to the patients from the other groups, presented significantly higher levels of inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$  (Fig. 1B), TNF- $\alpha$  (Fig. 1C), and IL-6 (Fig. 1D). A difference concerning the profile of these cytokines could be observed when comparing the CARD and IND groups ( $P < 0.0001$ ), the CARD and NI groups ( $P < 0.0001$ ), and the IND and NI groups ( $P < 0.0013$ ), verifying significantly lower levels of cytokines in the NI group when compared to the other groups. However, no significant difference could be observed when comparing the IL-6 expression in the IND and NI groups ( $P = 0.061$ ) (Fig. 1D). Furthermore, the analysis of IL-1 $\beta$  expression showed no significant difference between the CARD and IND groups ( $P = 0.195$ ) (Fig. 1E). In the CARD group, the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  was significantly higher (medians 50.85 and 31.76, respectively) than in the IFN- $\gamma$  (median 17.44) and the IL-1 $\beta$  (median 12.58) ( $P < 0.0001$ ). This finding clearly demonstrates that IL-10 is higher in the IND group, while IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 are higher in the CARD groups, as compared to the NI group.

The IFN- $\gamma$ /IL-10 and TNF- $\alpha$ /IL-10 ratios proved to be significantly higher in the CARD patients ( $P < 0.0001$ ) than in the IND and NI patients. (Fig. 2A and Fig. 2B, respectively) The IL-6/IL-10 and IL-1 $\beta$ /IL-10 ratios were significantly higher in the CARD group ( $P < 0.0001$ ) than in the other groups (Fig. 2C and Fig. 2D, respectively).

## **Establishing the cut-off edge to define low, medium and high cytokine producers**

To establish the cut-off edge that allows for patients with polar forms of Chagas disease to be divided into three categories, defined as low, medium, and high cytokine producers, and based on the detailed analysis of individual levels of cytokine expression obtained for NI, IND, and CARD groups, a statistical method that employed cut-off points for tertiles, as illustrated for IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  plasma (Fig. 3), was applied. This method reflects the wide dispersion and non-parametric distribution of cytokine expression, as occurs in chronic Chagas cardiopathy.

The data analysis demonstrated that the IND group contains a significantly higher frequency ( $P < 0.001$ ) of high IL-10 producers (76% 63/82) than do the other groups (Fig. 3A). Additional analysis revealed that a small proportion (7.5%, 7/94) of CARD patients displayed IL-10 plasma values of above the cut-off edge for IL-10 high cytokine producers (Fig. 3A). Moreover, no individuals could be identified as high IL-10 producers in the NI group (Fig. 3A). By contrast, the most CARD patients display values of IFN- $\gamma$  plasma that are above the cut-off edge, significantly higher than NI and IND individuals ( $P < 0.001$ ), whereas approximately 9.6% (9/94) and 21.3% (20/94) of CARD patients were identified as low and medium IFN- $\gamma$  producers, respectively (Fig. 3B). It is interesting to note that the analysis of plasma cytokines demonstrated that none of the IND individuals fell into a region of high TNF- $\alpha$  producers, unlike CARD patients who were confined to a level above the cut-off edge established for high TNF- $\alpha$  producers (Fig. 3C). In the CARD group, it could be observed that most of the IL-6 producers tended to be confined to the second tertile, established as the cut-off edge for medium IL-6 producers (26.6%, 25/94), while the frequency of high IL-6 producers (19.15%, 18/94) was higher than that found for low IL-6 producers from this same group (3.2%, 3/94) ( $P < 0.001$ ) (Fig. 3D). Furthermore, no significant difference in the frequency of high-IL-1 $\beta$  producers could be observed when comparing the CARD and IND groups, (30.5%, 25/82) and (36.17%, 34/94), respectively ( $P = 0.171$ ) (Fig. 3E).

### **Correlation analysis between plasma cytokine levels and echocardiographic variable markers of cardiac morbidity**

To confirm whether IL-10 expression is in fact correlated with improved cardiac function, and thus with a protective role in human Chagas disease, a correlation analysis was performed between the plasma levels of IL-10, in producers from the CARD or IND groups with cardiac performance expressed by two clinical variables: left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular diastolic diameter (LVDD). Similarly, correlation analysis was performed to determine how inflammatory cytokines, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1  $\beta$ , are associated with cardiac function.

As expected, a significant negative correlation between lower LVDD and higher MIF of IL-10 could be observed in the IND group (Fig. 4A). However, a significant positive correlation could be found between higher LVEF and higher MIF of IL-10 in the same group (Fig. 4A). No significant correlation could be identified upon comparing MIF IL-10 with LVDD in CARD group (Fig. 4A). Positive correlation could be found between higher LVEF and higher MIF of IL-10 in CARD group (Fig. 4A). Data analysis showed the likely protective role of this cytokine against cardiac damage in human Chagas disease.

According to the levels of IFN- $\gamma$  in the IND group, no correlation between higher LVDD and higher MIF of this cytokine could be identified (Fig. 5A). However, a significant negative correlation between lower LVEF and higher MIF of this cytokine was detected in same group, although less expressive (Fig. 5A). A significant positive correlation could be observed between higher LVDD and higher MIF of IFN- $\gamma$  in patients with cardiomyopathy (Fig. 5A). Conversely, a significant negative correlation could also be found between lower LVEF and higher MIF of IFN- $\gamma$  in the CARD group (Fig. 5A). When comparing MIF of TNF- $\alpha$  and LVDD in the CARD group, a positive correlation could be observed (Fig. 5B). Surprisingly, in cardiomyopathy patients, MIF of TNF- $\alpha$  levels inversely correlated with LVEF (Fig. 5B). No correlation could be formulated between MIF of TNF- $\alpha$  and echocardiographic variables of the cardiac function in the IND group (Fig. 5B). Similar results were verified for MIF of IL-6 (Fig. 5C). Regarding the correlation analysis between higher MIF of IL-6 and higher LVDD in the CARD group, a significant positive correlation could be observed (Fig. 5C). By contrast, a

significant negative correlation could be verified between MIF of IL-6 and LVEF in same group. Interestingly, in all studied groups, no significant correlation could be identified upon comparing MIF of IL-1 $\beta$  with LVDD (IND group,  $r=0.1205$ ,  $P=0.2809$  and CARD group  $r=0.0372$ ,  $P=0.7217$ ) and LVEF (IND group,  $r= -0.0707$ ,  $P=0.4985$  and CARD group  $r=0.0707$ ,  $P=0.7217$ ).

## DISCUSSION

Although the exact mechanisms associated with the development of pathology in human Chagas disease have not been fully clarified, the implication of the host's immune system in dealing with disease seems to be well-established. It has been hypothesized that a failure in the immune system is more likely to be involved in the pathogenesis of Chagas disease and that the chronic forms result from multifactorial immunological mechanisms. Impairment in the cytokine network has been pointed out as one of the determining factors in disease morbidity [13,14,28].

The results of the present work revealed that CARD patients, as compared to IND and NI individuals, present a strong immune response by expressing high levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6. By contrast, higher levels of IL-10 could be observed in the IND group when compared to the NI and CARD groups. These results have been supported by findings from previous studies [13,22,29]. The interpretation of these findings allows for the association of this cytokine expression pattern with cardiac damage in the clinical groups of patients evaluated in this study.

Interestingly, a wide data scatter could be observed in the groups evaluated in terms of cytokine expression. This variability was determined by analyzing the plasma levels of cytokines in each group of patients included in the study. Despite the significant variability observed in the cytokine levels that present inflammatory activity, their expressions were directly associated with the severe forms of this disease. Conversely, levels of these cytokines were inversely associated with individuals classified as patients with an IND form of Chagas disease. Similarly, a direct association could be observed between high levels of IL-10, which presented a well-established anti-inflammatory activity, and the IND form, evidenced by their significantly higher frequency in patients from the IND group as

compared to the other groups. It is important to mention that the ratios between inflammatory and regulatory cytokines, as shown by the present study's results, were significantly higher in the CARD group than that verified in the IND and NI groups. Analysis of these findings shows a narrowed relation between the cytokine expression and the cardiac morbidity expressed by clinical classification of the Chagas disease. The modulating activity of IL-10-producing macrophages and Treg cells may well maintain a balance between parasitism and tissue integrity in IND patients, during which mild inflammatory foci develop into focal fibrosis [14]. In addition, a contained Th1 response would perhaps keep parasitism under relative control. The progressive destructive process in cardiomyopathy patients could therefore result from a failure of a pathogenic Th1 response, downgraded by IL-10. This failure could, in turn, depend on host genetic characteristics, on age-dependent changes of the immune system, or on the superposition of infections by unrelated microorganisms and/or by *T. cruzi* reinfection [13].

Prior literature has already reported that a detailed analysis of individual levels of cytokines allows one to characterize the cytokine profile of NI, IND and CARD individuals [13,14,17,28]. These studies employed the mean value of stimulated [28] or unstimulated cultures with *T. cruzi* antigens [13,14], or even the global median percentage of each cytokine positive cell population [17], as the cut-off edge to divide the individuals into two categories: low and high cytokine producers. However, this kind of analysis does not truly reflect what is actually observed as regards the cytokine profile, considering that a wide dispersion of the group can be identified in terms of cytokine production and that its distribution is abnormal. Therefore, establishing the mean or global median percentage of each cytokine positive cell population as the cut-off edge to divide the individuals into categories of cytokine production may not be quite so exact, in turn reflecting what occurs due to the nature of this disease. The existence of a large spectrum of clinical manifestations – with patients ranging from asymptomatic to severe cardiac involvement – emphasizes the need to use standardized and well-defined clinical criteria among different research groups [30]. The present study employed an alternative strategy in an attempt to establish the cut-off edge that allows for a division of the individuals according to cytokine production. The chosen method was meant to reflect the wide dispersion and non-parametric distribution of the cytokine expression that occurs in chronic chagasic cardiopathy. To establish the

cut-off edge that allows for the division of the individuals into categories that characterize the cytokine expression profile, a detailed analysis of individual levels of cytokines expression were obtained for the NI, IND, and CARD groups. Therefore, a specific statistical method based in tertiles was used to determine the cut-off points [31]. Patients belonging to the NI, IND, and CARD groups could be characterized in four categories: low, medium and high cytokine producers (for all evaluated cytokines), high inflammatory cytokine producers (for IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6), and high regulatory cytokine producers (for IL-10). Additionally, the individuals also could be characterized, in a simplified form, using the tertiles method as low, medium, and high cytokine producers.

Sixty-nine percent of CARD patients were defined as high IFN- $\gamma$  producers, whereas only 4.9% of IND patients presented this profile of IFN- $\gamma$  expression. The CARD group showed 71.3% of high TNF- $\alpha$  producers, as compared to the IND group which was confined to the range established by cut-off points for low and medium TNF- $\alpha$  producers. Similar results could also be identified when analyzing the IL-6 levels in the evaluated groups, although to a lesser extent. These findings suggest a relationship between the expression of these inflammatory cytokines, especially IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , and the development of heart disease. Prior literature has also reported that IFN- $\gamma$  is the cytokine most frequently found in the inflammatory cells of the myocardium of patients with Chagas disease [23]. It is currently accepted that IFN- $\gamma$  production may contribute to the development of cardiomyopathy. However, some studies have found that a large proportion of IND individuals also produced high levels of IFN- $\gamma$ , which raises questions concerning the role of this cytokine in this group of patients [28,32,33].

The present study showed a small proportion of IND patients that presented high levels of IFN- $\gamma$ , whereas a significant percentage of these patients express high levels of IL-10. A recent study on the functional polymorphism 251082 G/A of the IL-10 gene revealed that the polymorphic allele, related to the lower IL-10 expression, is in fact associated with the development of chagasic cardiomyopathy. This finding suggests that the capacity to express sufficient amounts of IL-10 to modulate the inflammatory response may well be genetically determined [34]. It is also possible that patients with high levels of IFN- $\gamma$  tend to be prone to developing clinical forms defined throughout the course of the disease. The fact that the IND patients involved in these studies are in fact high producers

of IFN- $\gamma$  and IL-10 can serve to support the hypothesis of the association of a fine balance between regulatory and inflammatory cytokines, with cardiac morbidity expressed by the clinical classification of chronic chagasic cardiopathy.

Considering the chronic nature of heart disease and the fact that many IND patients also produce high levels of IFN- $\gamma$ , in addition to other inflammatory cytokines [12-14,35], it is likely that immunoregulatory mechanisms are present in the disease that can strongly influence its clinical evolution [30].

Chagas disease patients with the IND form present Treg cells are able to modulate the effector function of CD8<sup>+</sup> T-cells in a microenvironment supported by cytotoxic NK-cells, Monocytes, and CD4<sup>+</sup> T-cells producing regulatory cytokines (IL-10, IL-4, and IL-13). This immunological milieu contributes to controlling parasitemia and regulating immunopathology. By contrast, Chagas disease patients with the CARD form display an insufficient modulation caused by Treg cells with activated CD8<sup>+</sup> T-cells, along with monocytes and CD4<sup>+</sup> T-cells, which produce inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . This microenvironment triggers immunopathological events and can lead to tissue damage when regulatory mechanisms and cytotoxic NK-cell functions are absent [13,14,17,19,33,36,37].

Correlation analysis was performed comparing plasma cytokine levels and echocardiographic variables of the cardiac function (LVEF and LVDD). These distinct clinical variables are directly and inversely correlated with a better cardiac function, respectively [4]. The present study verified an expressive and significant positive correlation could be observed between IL-10 expression and LVEF in the IND group. In these patients, no correlation could be identified between the expression of this cytokine and LVDD. Conversely, a significant and strong inverse correlation between plasma inflammatory cytokine expression (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6) and LVEF was observed in the CARD group. By contrast, only IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  present a significant direct correlation, albeit less expressive with LVDD in this same group. The results again suggest that IL-10 plays a regulatory role in Chagas disease and is clearly involved in protecting against cardiac damage. Additionally, inflammatory cytokines, especially IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , proved to be associated with the development of heart disease in this infection.

In summary, the strong and significant correlation identified between the expressions of high levels of regulatory cytokines, such as IL-10, in IND individuals



and variables of the cardiac function, associated with the significant correlation between these variables and high expressions of inflammatory cytokines in CARD patients, demonstrates the narrow relationship with cardiac morbidity. Taken together, these findings indicate that a fine balance between regulatory and inflammatory cytokines represents a key element in the establishment of distinct forms of chronic Chagas disease, as previously suggested [17,38]. Furthermore, this study helped to shed light on the complex cytokine network underlying the immunopathogenesis of chronic chagasic cardiopathy.

### **Acknowledgments**

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant 478846/2009-6), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; grant APQ-02601-10), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT and Federal University of Minas Gerais. We are thankful to the CNPq and FAPEMIG grant agencies in Brazil for their financial support. We also wish to thank the staff from Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, FIOCRUZ and Flow Cytometry Platform for the technical assistance. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health – PDTIS – FIOCRUZ for the use of its facilities. MOCR and RCO thank CNPq for fellowships (PQ).

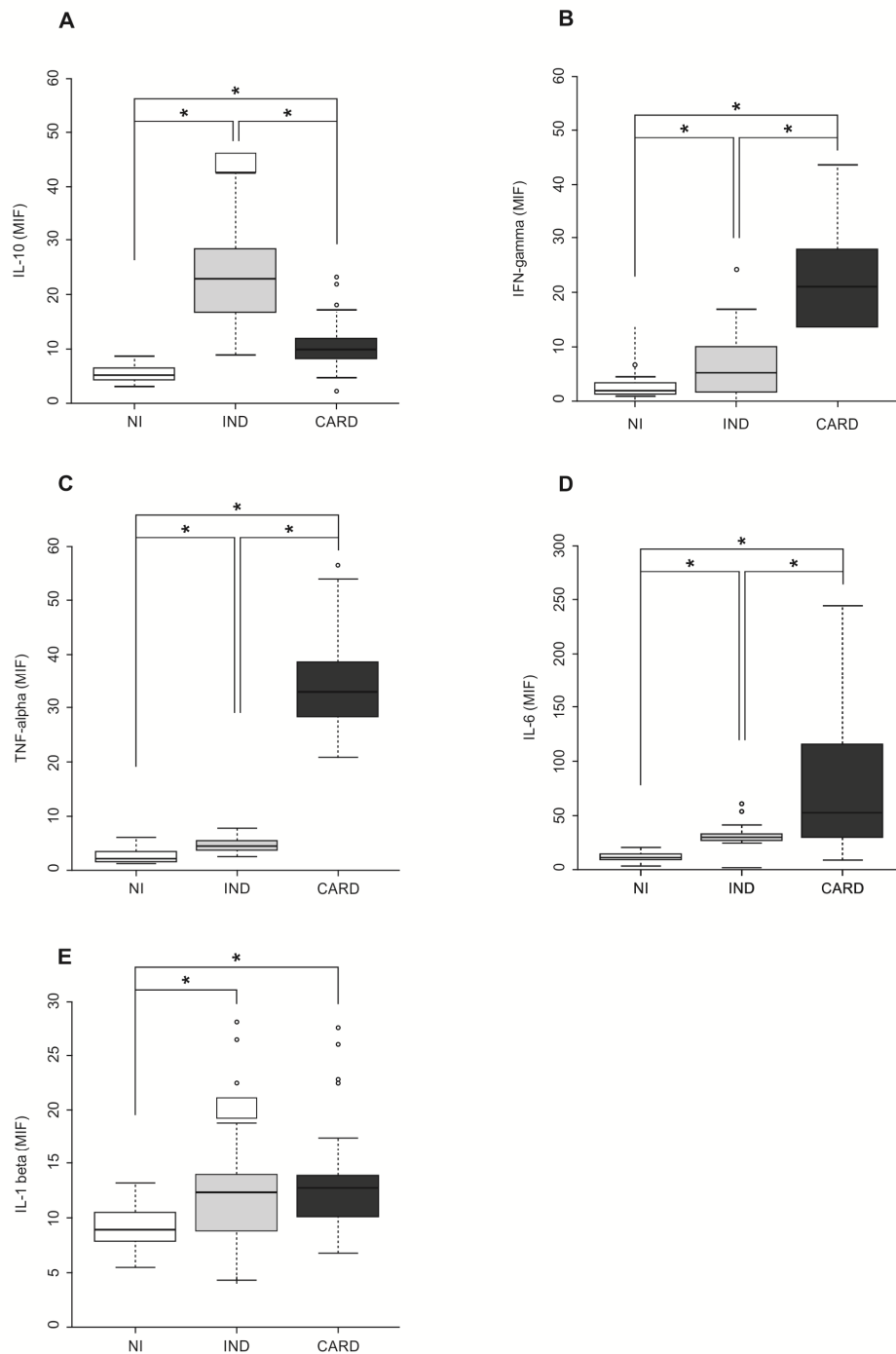
## References

- 1 PAHO - Pan American Health Organization (2007). Meeting: Conclusions and Recommendations from the Joint IPA-AMCHA Annual Meeting (Quito, Ecuador, Technical Guidelines for Prevention and Control of Chagas Disease, PAHO/MSF Regional Consultation on the Organization and Structure of Health Care (IEC) on Congenital Chagas Disease (CLAP, Montevideo, 17-18 May 2007).
- 2 Wilson LS, Strosberg AM, Barrio K (2005) Cost-effectiveness of Chagas disease interventions in Latin America and the Caribbean: Markov models. *Am J Trop Med Hyg* 73: 901–910.
- 3 Rocha MO, Ribeiro AL, Teixeira MM (2003) Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front Biosci* 1: 44–54.
- 4 Rocha MO, Teixeira MM, Ribeiro AL (2007) An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5: 727–743.
- 5 Andrade ZA (1999) Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 71–80.
- 6 Andrade ZA (2000). Patologia da doença de Chagas. In: Z Brener, Z Andrade, M Barral-Netto, *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2nd ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 201–230.
- 7 Coura JR (2007) Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 113–122.
- 8 Rossi MA (1998) Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *Int J Cardiol* 66: 183–194.
- 9 Rossi MA, Ramos SG, Bestetti RB (2003) Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. *Front Biosci* 8: 94–109.
- 10 Ribeiro AL, Lombardi F, Sousa MR, Lins Barros MV, Porta A, et al (2002) Power-law behavior of heart rate variability in Chagas' disease. *AM J Cardiol* 89: 414–418.
- 11 Ribeiro AL, Moraes RS, Ribeiro JP, Ferlin EL, Torres RM, et al. (2001) Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. *Am Heart J* 141: 260–265.
- 12 Dutra WO, Gollob KJ, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, et al. (1997) Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scand J Immunol* 45: 74–80.

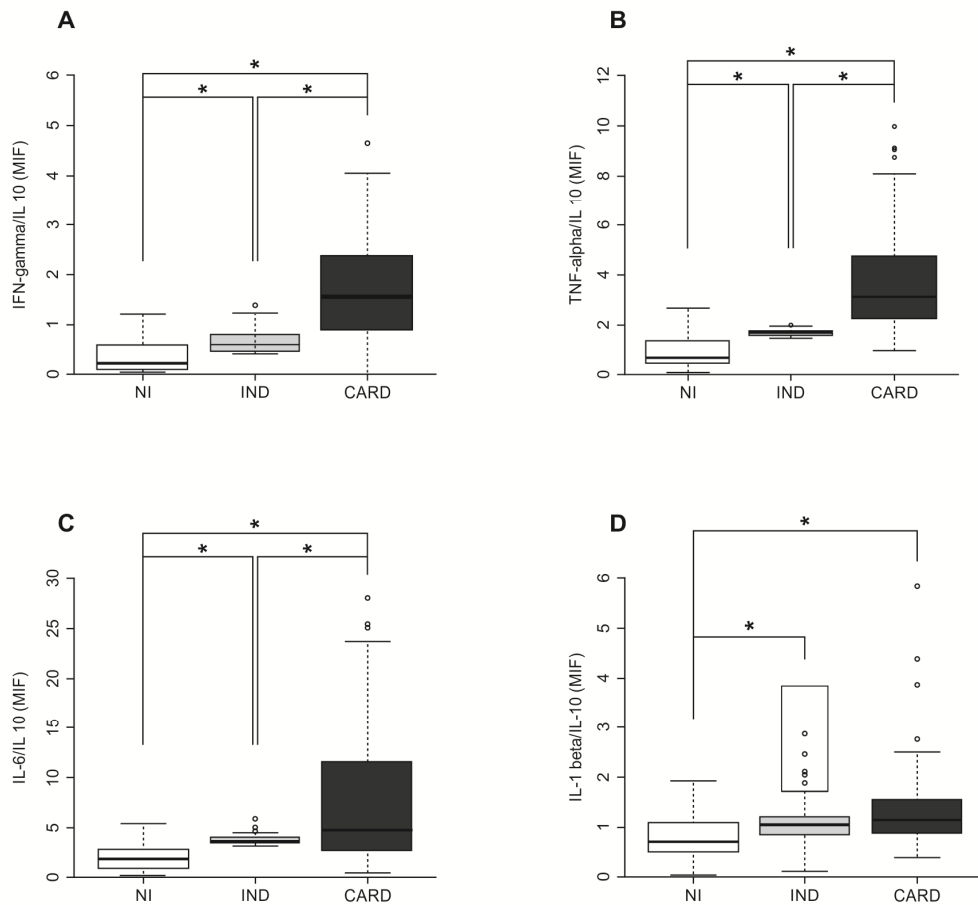
- 13 Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, et al. (2005) Type 1 chemokine receptor expression in Chagas disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun* 73: 7960–7966.
- 14 Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, et al. (2003) Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun* 71: 1185–1193.
- 15 Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, et al. (1993) Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- $\alpha$  cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg* 48: 637–644.
- 16 Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, Menezes CA, Chaves AC, et al. (2004) Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun* 72: 5283–5291.
- 17 Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Pinto Dias JC, Gontijo ED, et al. (2008) Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. *Scand J Immunol* 68: 516–525.
- 18 Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, et al. (2001) Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun* 17: 99–107.
- 19 de Araújo FF, Corrêa-Oliveira R, Rocha MO, Chaves AT, Fiuza JA, et al. (2012) Foxp3+CD25(high) CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. *Immunobiology* 217: 768–777.
- 20 Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, et al. (2003) Increased plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 407–411.
- 21 Ribeirão M, Pereira-Chiocola VL, Renia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, et al. (2000) Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol* 22: 49–53.
- 22 Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, et al. (2004) Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 38: 943–950.
- 23 Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, et al. (1997) An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of

- myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 83: 165–172.
- 24 Araújo FF, Gomes JA, Rocha MO, Williams-Blangero S, Pinheiro VM, et al. (2007) Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci* 1: 2797–2806.
  - 25 de Araújo FF, da Silveira AB, Correa-Oliveira R, Chaves AT, Adad SJ, et al. (2011) Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Hum Pathol* 42: 299–301(a).
  - 26 de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, et al. (2011) Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e992(b).
  - 27 Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai K, et al. (1999) Simultaneous quantification of six cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chem* 45: 1693–1694.
  - 28 Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Rocha MO, Moreira MC, Lemos EM, et al. (1998) IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 127–131.
  - 29 Dutra WO, Colley DG, Pinto-Dias JC, Gazzinelli G, Brener Z, et al. (2000) Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5C B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. *Scand J Immunol* 51: 91–97.
  - 30 Dutra WO, Rocha MO, Teixeira MM (2005) The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology* 21: 581–587.
  - 31 Altman DG (1991) *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall 419–426.
  - 32 Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SI, Sher A (1992) The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves a 1-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European J Immunol* 22: 2501–2506.
  - 33 Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, et al. (2006) Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+ CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol* 145: 81–92.
  - 34 Costa GC, da Costa Rocha MO, Moreira PR, Menezes CA, Silva MR, et al. (2009) Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. *J Infect Dis* 199: 451–454.

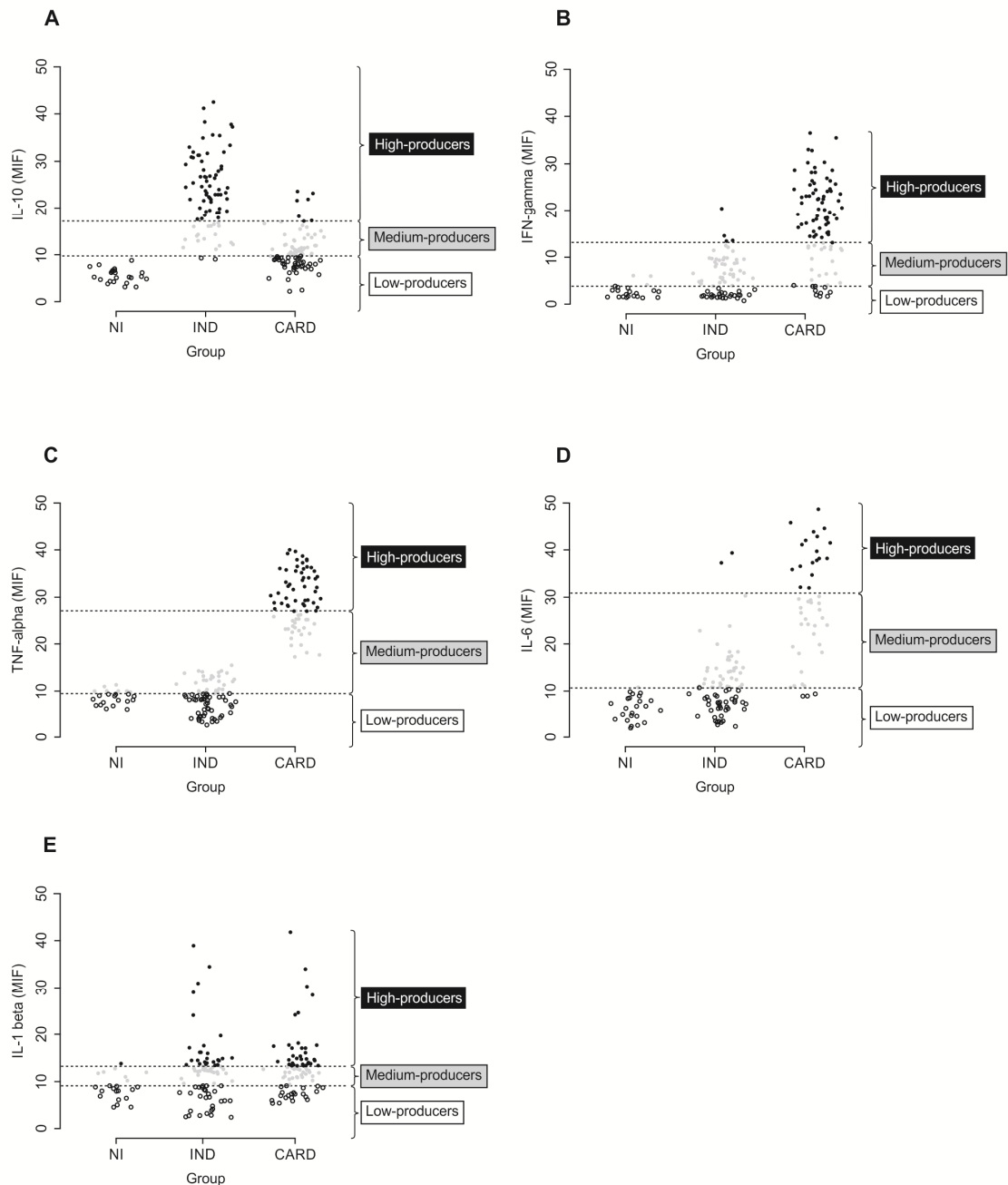
- 35 de Barros-Mazon S, Guariento ME, da Silva CA, Coffman RL, Abrahamsohn IA (2004) Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clin Immunol* 111: 137–145.
- 36 Colorado IA, Acquatella H, Catalioti F, Fernandez MT, Layrisse Z (2000). HLA class II DRB1, DQB1, DPB1 polymorphism and cardiomyopathy due to *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Hum Immunol* 61: 320–325.
- 37 Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Dias JC, Pascoal VP, Teixeira-Carvalho A, et al. (2005) Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+ CD16) CD56+ natural killer T cells and CD4+ CD25High regulatory T lymphocytes. *Scand J Immunol* 62: 297–308.
- 38 Crema E, Monteiro Ide O, Gomes MG, Silva AA, Rodrigues Júnior V (2006). Evaluation of cytokines (MIG, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-5, and IL-10) during the different evolutive phases of chagasic esophagopathy. *Clin Immunol* 119: 213–218.



**Figure 1. Analyses of plasma cytokine levels and their association with cardiac morbidity expressed by the clinical classification.** The analysis of plasma levels was performed as described in material and methods. The groups evaluated were: NI (n = 24, white box), IND (n = 82, light gray box), and CARD (n = 94, dark gray box). The results were expressed by mean intensity of fluorescence (MIF). (A) Plasma IL-10 levels in NI, IND, and CARD groups and their association with cardiac morbidity. (B) Plasma IFN- $\gamma$  levels in NI, IND, and CARD groups and their association with cardiac morbidity. (C) Plasma TNF- $\alpha$  levels in NI, IND, and CARD groups and their association with cardiac morbidity. (D) Plasma IL-6 levels in NI, IND, and CARD groups and their association with cardiac morbidity. (E) Plasma IL-1 $\beta$  levels in NI, IND, and CARD groups and their association with cardiac morbidity. Significant differences ( $P < 0.05$ ) in the charts are identified by connecting lines and the symbol (\*) for comparisons between the groups.



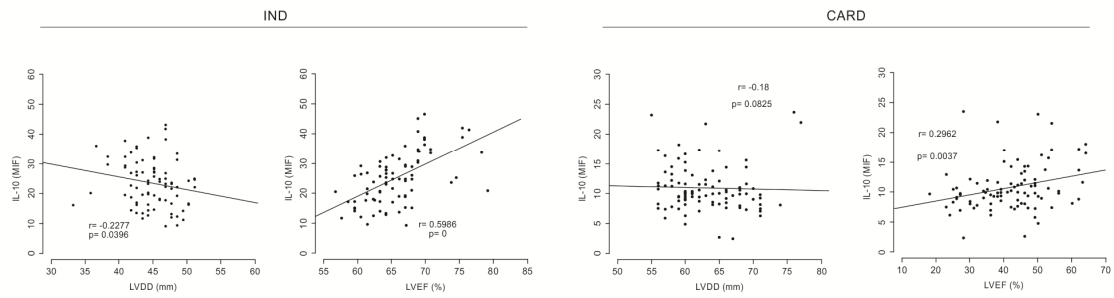
**Figure 2. Ratios of plasma cytokines from patients with distinct forms of Chagas disease.** The analysis of plasma levels was performed as described in material and methods. The groups evaluated were: NI (n = 24, white box), IND (n = 82, light gray box), and CARD (n = 94, dark gray box). The results are expressed by mean intensity of fluorescence (MIF). A) Ratios between IFN- $\gamma$  and IL-10 levels in NI, IND, and CARD groups. B) Ratios between TNF- $\alpha$  and IL-10 levels in NI, IND, and CARD groups. C) Ratios between IL-6 and IL-10 levels in NI, IND, and CARD groups. D) Ratios between IL-1 $\beta$  and IL-10 levels in NI, IND, and CARD groups. This analysis was employed to determine the balance between high-inflammatory or high-regulatory cytokines and to represent the predominant cytokine profile. Significant differences (P < 0.05) in the charts are identified by connecting lines and the symbol (\*) for comparisons between the groups.



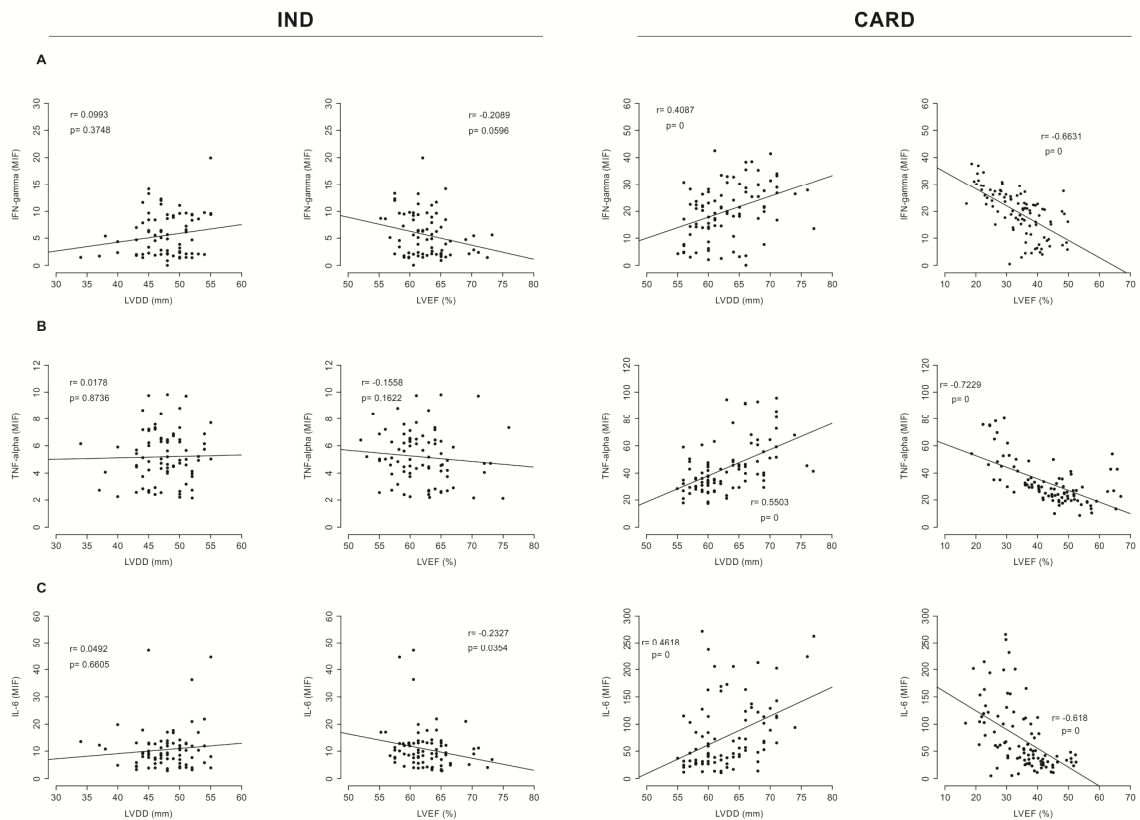
**Figure 3. Establishing the concept of low, medium and high cytokine producers.**

A) Representative scatter plot graph of plasma IL-10 used to establish the cut-off edge to define low, medium and high cytokine producers. B) Representative scatter plot graph of plasma IFN- $\gamma$  used to establish the cut-off edge to define low, medium and high cytokine producers. C) Representative scatter plot graph of plasma TNF- $\alpha$  used to establish the cut-off edge to define low, medium and high cytokine producers. D) Representative scatter plot graph of plasma IL-6 used to establish the cut-off edge to define low, medium and high cytokine producers. E) Representative scatter plot graph of plasma IL-1 $\beta$  used to establish the cut-off edge to define low, medium and high cytokine producers. Low cytokine producers were defined by values of lower than the first tertile. Medium cytokine producers were defined by values equal to or lower than the second tertile, while high cytokine producers were defined by values higher than or equal to the second tertile. Results were considered significant with a  $P < 0.05$ .





**Figure 4. Correlation analysis between plasma IL-10 levels and echocardiographic variable markers of cardiac morbidity.** Correlation analysis between plasma IL-10 levels and clinical variables of cardiac function (LVEF and LVDD) in the IND (n = 82, first column) and CARD (n = 94, second column) groups. Correlation analysis were done using the Spearman correlation coefficient and results were considered significant with a  $P < 0.05$ . Significant differences (P value) are indicated in each graph together with the r value.



**Figure 5. Correlation analysis between plasma IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 levels and echocardiographic variable markers of cardiac morbidity.** A) Correlation analysis between plasma IFN- $\gamma$  and clinical variables of cardiac function in the IND ( $n = 82$ , first column) and CARD ( $n = 94$ , second column) groups. B) Correlation analysis between plasma TNF- $\alpha$  and clinical variables of cardiac function in the IND ( $n = 82$ , first column) and CARD ( $n = 94$ , second column) groups. C) Correlation analysis between plasma IL-6 and clinical variables of cardiac function in the IND ( $n = 82$ , first column) and CARD ( $n = 94$ , second column) groups. Correlation analysis were done using the Spearman correlation coefficient and results were considered significant with a  $P < 0.05$ . Significant differences (P value) are indicated in each graph together with the r value.

## 6 CONCLUSÕES

- Pacientes com doença de Chagas com forma indeterminada apresentaram perfil imunológico regulador, expresso pela maior expressão de IL-10, comparados aos demais grupos.
- Pacientes com cardiomiopatia chagásica apresentaram perfil inflamatório, caracterizado pela predominante expressão de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 em relação à IL-10.
- O padrão de resposta imune caracterizado por maior expressão de citocinas inflamatórias associou-se à morbidade cardíaca expressa pela classificação clínica da doença de Chagas.
- Pacientes com forma indeterminada e com cardiomiopatia puderam ser categorizados, de acordo com os níveis de expressão, como: baixo, médio e alto produtor.
- Houve correlação entre a alta expressão de citocinas e variáveis determinantes da função cardíaca: diâmetro diastólico final e fração de ejeção ventricular esquerdo.
- A alta expressão de IL-10 correlacionou-se com melhor função cardíaca, expressa por fração de ejeção do ventrículo esquerdo elevada e reduzido diâmetro diastólico ventricular esquerdo (VED) em pacientes com forma indeterminada.
- Houve correlação entre a alta expressão de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) e pior função cardíaca, expresso por baixa fração de ejeção do ventrículo esquerdo e elevado VED em pacientes com cardiomiopatia.
- Existem sólidas evidências de que a alta expressão de IL-10 está associada ao papel cardioprotetor na cardiopatia chagásica crônica.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doença de Chagas é, reconhecidamente, uma moléstia polimórfica. Muitos indivíduos podem apresentar sorologia positiva e não exibir qualquer manifestação clínica atribuível à doença durante toda a vida. Por outro lado, outros podem desenvolver insuficiência cardíaca grave refratária a tratamento clínico ou ter morte súbita como desfecho. Diante disso, é importante a identificação de marcadores que possam melhor estratificar a população de pacientes chagásicos.

Considerando a natureza crônica da doença cardiopática chagásica e o fato de que muitos pacientes com forma indeterminada também produzem níveis elevados de IFN- $\gamma$ , além de outras citocinas inflamatórias, é possível admitir que os mecanismos imunorreguladores estão presentes na doença e que podem influenciar fortemente a sua evolução clínica. Os achados neste estudo indicam que o bom equilíbrio entre citocinas inflamatórias e reguladoras representa um elemento-chave no estabelecimento de formas distintas da doença de Chagas, como sugerido anteriormente (CREMA *et al.*, 2006; VITELLI-AVELAR, 2008). Além disso, ajudaram a lançar luz na complexa rede de citocinas subjacente a imunopatogênese da cardiopatia chagásica crônica.

A resposta imune parece apresentar ampla dispersão, pelo menos em termos de grupo nos indivíduos chagásicos. Por outro lado, esta variabilidade pode estar implicada nas diversas possibilidades evolutivas e no amplo espectro de morbidade apresentado pelos pacientes com doença de Chagas.

## 8 PROPOSIÇÕES

Para dirimir as dúvidas relacionadas ao comportamento heterogêneo dessa enfermidade, propõe-se a avaliar a ocorrência de estabilidade ou variabilidade no perfil da resposta imune, expresso pela produção de citocinas e quimiocinas, em pacientes chagásicos com forma indeterminada e com cardiopatia dilatada, bem como em indivíduos não chagásicos saudáveis, controles. Além disso, propõe-se a verificar a relação entre esses parâmetros imunológicos e outras variáveis marcadoras de morbidade cardíaca, como: número de extrasístoles ventriculares em 24 horas à eletrocardiografia dinâmica; presença de extrassístolia ventricular induzida ou agravada pelo esforço e taquicardia ventricular não sustentada ao teste ergométrico.

O objetivo é verificar se a expressão fenotípica da resposta imunológica, caracterizada pelos níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticas, em diferentes momentos durante o curso crônico da doença, está associada ao grau morbidade em pacientes com formas crônicas polares da doença de Chagas. A verificação de estabilidade em termos de produção de citocinas e quimiocinas, a curto, médio e longo prazo, seja individual ou em grupos de indivíduos, seria importante. Além disso, implica a possibilidade de se estimar o perfil de resposta imune por apenas uma medida, sendo o contrário, também, possivelmente verdadeiro.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, L.C. *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Autoimmun**, v. 17, n. 1, p. 99-107, Aug. 2001.
- ABEL, L.C. *et al.* Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human Tcell clone that recognizes cardiac myosin. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, p. 1305-1308, 1997.
- ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp Parasit**, v. 84, p. 231-244, 1996.
- ACOSTA, A.M.; SANTOS-BUCH, C.A. Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. **Circulation**, v. 71, p. 1255-1261, 1985.
- ACQUATELLA, H. Echocardiography in Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1124-31, Mar. 2007.
- ACQUATELLA, H. *et al.* Long-term control of chagas disease in venezuela: effects on serologic findings, electrocardiographic abnormalities, and clinical outcome. **Circulation**, v. 76, n. 3, p. 556-62, Sep. 1987.
- AL-SABBAGH, A. *et al.* Evidence for cross-reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein in experimental Chagas disease. **Exp Parasitol**, v. 89, n. 3, p. 304-11, Jul. 1998.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, Supl 1, p. S62-9, Jan. 2010.
- ANDRADE, Z.A. Anatomia patológica da doença de Chagas. **Rev Goiana Med**, v. 4, n. 1, 1958.
- ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. Pathogenesis of Chagas' chronic myocarditis; importance of ischemic lesions. **Arq Bras Med**, v. 45, n. 7-8, p. 279-88 Jul-Aug 1955.
- APT, B.W. *et al.* Laboratory diagnosis of Chagas disease. **Rev Chilena Infectol**, v. 25, n. 5, p. 380-3, Oct. 2008.
- ARANTES, J.M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: treatment with the iron chelator desferrioxamine reduces parasitemia and mortality in experimentally infected mice. **Exp Parasitol**, v. 117, n. 1, p. 43-50, Sep. 2007.
- ARAÚJO, F.F. *et al.* Characterization of the presence of Foxp3(+) T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. **Hum Pathol**, v. 42, n. 2, p. 299-301, Feb. 2011.

ARAÚJO, F.F. *et al.* Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Front Biosci**, v. 1, n. 12, p. 2797-806, May 2007.

ARAÚJO, F.G. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. **Infect Immun**, v. 57, n. 7, p. 2246-8, Jul. 1989.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos - apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT. **NBR 14724**: informação e documentação - trabalhos acadêmicos - apresentação. Rio de Janeiro, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT. **NBR 6023**: informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AZUMA, M.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L. CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. **J Immunol**, v. 150, n. 4, p. 1147-59, Feb. 1993.

BAECHER-ALLAN, C. *et al.* CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol**, v. 167, n. 3, p. 1245-53, Aug. 2001.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M. *et al.* IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 1, p. 127-31, Jan. 1998.

BAKER, B.J. *et al.* Relation of right ventricular ejection fraction to exercise capacity in chronic left ventricular failure. **Am J Cardiol**, v. 54, n. 6, p. 596-9, Sep. 1984.

BARBOSA, F.B.L. **Lesão apical e arritmogenicidade na cardiopatia chagásica crônica**. Tese [Mestrado] - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010. 79 p.

BARBOSA, M.M. *et al.* N-terminal proBNP levels in patients with Chagas disease: A marker of systolic and diastolic dysfunction of the left ventricle. **Eur J Echocardiogr**, v. 8, p. 204-12, 2007.

BARBOSA, M.P.T. **Evolução pós-implante de cardiodesfibrilador implantável em pacientes chagásicos e não-chagásicos: estudo comparativo são apical e arritmogenicidade na cardiopatia chagásica crônica**. Tese [Mestrado] - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2009. 84 p.

BARROS, M.V.L. *et al.* Diastolic function in Chagas' disease: an echo and tissue doppler imaging study. **Eur J Echocardiography**, v. 5, p. 182-8, 2004.

- BARROS, M.V.L. *et al.* Tissue doppler Imaging in the evaluation of the regional diastolic function in Chagas' disease. **Eur J Echocardiography**, v. 2, p. 94-99, 2001.
- BESTETTI, R.B. *et al.* Clinical and morphological characteristics associated with sudden cardiac death in patients with Chagas' disease. **Eur Heart J**, v. 14, p. 1610-14, 1993.
- BESTETTI, R.B.; MUCCILLO, G. Clinical course of Chagas' heart disease: A comparison with dilated cardiomyopathy. **Int J Cardiol**, v. 60, n. 2, p. 187-93, 1997.
- BOCCHI, E.A. *et al.* Heart transplantation for chronic Chagas' heart disease. **Ann Thorac Surg**, v. 61, n. 6, p. 1727-33, Jun. 1996.
- BOGLIOLO, L. Anatomic causes of cardiac insufficiency in chronic chagasic cardiopathy (myocarditis) studied in comparison to anatomic causes of cardiac insufficiency in other cardiopathies. Part I. **Arq Bras Cardiol**, v. 29, n. 5, p. 419-24, out, 1976a.
- BOGLIOLO, L. Anatomic causes of heart failure in chronic Chagas cardiopathy (myocarditis) studied comparatively with the anatomic causes of heart failure in other cardiopathies. Part II. **Arq Bras Cardiol**, v. 29, n. 6, 479-83, Dec. 1976b.
- BRAGA, J.C. *et al.* Is Chagas cardiomyopathy an independent risk factor for patients with heart failure? **Int J Cardiol**, v. 126, n. 2, p. 276-8, May. 2008.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Brazilian Consensus on Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, Supl 3, p. 7-29, 2005.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanossoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol**, v. 27, p. 347-82, 1973.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 114, n. 2, p. 103-10, Oct. 1997.
- BUSCAGLIA, C.A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, p. 229-36, 2006.
- CAEIRO, T. *et al.* Abnormal left ventricular diastolic function in chronic Chagas' disease: an echocardiographic study. **Int J Cardiol**, v. 9, p.417-424, 1985.
- CAMPOS LOPES, C.B. *et al.* Socioeconomic factors in the prognosis of heart failure in a Brazilian cohort. **Int J Cardiol**, v. 113, p.181-7, 2006.
- CARDILLO, F. *et al.* Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10. Role of NK cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 1, p. 128-34, 1996.



CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHANDRASEKAR, B. *et al.* Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Am J Pathol**, v. 152, n. 4, p. 925-34, Apr. 1998.

CHEN, R. *et al.* Simultaneous quantification of six cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. **Clin Chem**, v. 45, n. 9, n.1, p.1693–1694, 1999.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, S4-5, jun, 2010.

CORDER, G.W.; DALE, I.F.. **Nonparametric Statistics for Non-Statisticians**. 1st ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc p. 99-105, 2009.

COSSIO, P.M. *et al.* *In vitro* interactions between lymphocytes of chagasic individuals and heart tissue. **Medicina (B. Aires)**, v. 36, n. 4, p. 287–293, 1976.

COURA, J.R. Determinantes epidemiológicos da doença de chagas no brasil: a infecção, a doença e sua morbimortalidade. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83 (Supl. 1), p. 392-402, 1988.

COURA, J.R., DIAS, J.C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.104 (Supl. 1), n. 1, p. 31-40, Jul. 2009.

COURA, J.R. *et al.* Morbidity in Chagas' disease. IV. Longitudinal study of 10 years in Pains and Iguatama, Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 1, p. 73-80, Jan-Mar. 1985.

CREMA, E. *et al.* Evaluation of cytokines (MIG, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-5 and IL-10) during the different evolutive phases of chagasic esophagopathy. **Clin Immunol**, v. 119, p. 213-18, 2006.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of cardiac myosin – specific epitope crossreactive to na immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, n. 8, p. 3541-45, 1995.

CUNHA-NETO, E. *et al.* Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, (Supl. 1), p. 252-8, Jul. 2009.

DATASUS. SIM – **Sistema de Informações de Mortalidade**. 2010 October 1 2012 [cited October 1 2012]; Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: outubro de 2012.

DIAS, E.; LARANJA, F.S.; NOBREGA, G. Doença de Chagas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 43, p. 495-581, 1945.

DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública**, v. 11, p. 13-22, 2007.

DIAS, J.C.P. História natural. In: CANÇADO, J.; CHUSTER, M. (ed.). **Cardiopatia Chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, cap. 11, p. 99-113, 1985.

DIAS, J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 22, n. 3, p. 147-56, Jul-Sep., 1989.

DUTRA, W.O. *et al.* Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. **Int Immunol**, v. 6, n. 4, p. 499-506, Apr. 1994.

DUTRA, W.O. *et al.* Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. **Scand J Immunol**, v. 43, n.1, p. 88-93, Jan. 1996.

DUTRA, W.O. *et al.* Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. **Scand J Immunol**, v. 51, p. 91-97, 2000.

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

ELIAS, F.E. *et al.* Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, n. 2, p. 242-7, Feb. 2003.

ESPINOSA, R.A. *et al.* Prognostic indicators of chronic chagasic cardiopathy. **Int J Cardiol**, v. 30, n. 2, p. 195-202, Feb. 1991.

FERREIRA, C.S. Aspectos radiológicos. In: CANÇADO, J.; CHUSTER, M. (eds). **Cardiopatia chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas p. 169-83, 1985.

FRANCO, D.J. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. **Exp Parasitol**, v. 104, p. 54-61, Mai-Jun. 2003.

GAZZINELLI, R.T. *et al.* The microbial activity of IFN-gamma- treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- $\beta$ . **Eur J Immunol**, v. 22, p. 2501-06, 1992.

GOMES, J.A. *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect Immun**, v. 71, n. 3, p. 1185-93, Mar. 2003.

- GOMES, J.A. *et al.* Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infect Immun**, v. 73, n. 12, p. 7960-6, dez, 2005.
- HAGAR, J.M.; RAHIMTOOLA, S.H. Chagas' heart disease in the united states. **N Engl J Med**, v. 325, n. 11, p. 763-8, Sep. 1991.
- HARDY, R.R. *et al.* Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5+ B cells. **Immunol Rev**, v. 137, p. 91-118, Feb. 1994.
- HARDY, R.R.; HAYAKAWA, K. Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog, Leu-1 B. **Immunol Rev**, v. 93, p. 53-79, Oct. 1986.
- HIGUCHI, M.L. *et al.* Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v. 423, n. 3, p. 157-60, 1993.
- HIGUCHI, M.L. *et al.* Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Card Res**, v. 60, p. 96-107, 2003.
- HOLSCHER, C. *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*: infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect Immun**, v. 66, p. 1208-1215, 1998.
- HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *et al.* L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. **Eur J Immunol**, v. 17, n. 7, p. 1027-33, Jul. 1987.
- HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Murine *Trypanosoma cruzi* infection: a role for TH2 cells in the immunopathology of chronic infection. **Res Immunol**, Feb. v. 142, n. 2, p. 141-3, 1991.
- JONES, E.M. *et al.* Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 3, p. 348-57, Mar. 1993.
- JUNQUEIRA JÚNIOR, L.F. Disfunção autonômica cardíaca, arritmogênese e morte súbita chagásica: perspectiva fisiopatológica. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 26 (Supl 2), p. 30-5, 1993.
- KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? **Parasitol Today**, v. 12, p. 396-99, 1996.
- KIERSZENBAUM, F. Autoimmunity in Chagas' disease. **J Parasitol**, v. 72, n.2, p. 201-11, Apr. 1986.
- KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 2, p. 210-23, Apr. 1999.

KRUSKAL, W.H. Historical notes on the wilcoxon unpaired two-sample test. **J Am Statist Assoc**, v. 52, n. 279, p. 356–360, 1957.

LAGUENS, R.P. *et al.* Chronic Chagas disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. **Medicina (B Aires)**, v. 41, n. 1, p. 40-3, 1981.

LAMOURIER, E.N. *et al.* Aneurysmectomy as the treatment for refractory tachycardias in patients with ventricular arrhythmias of chagasic etiology. **Arq Bras Cardiol**, v. 28, n. 5, p. 549-55, Oct. 1975.

LARANJA, F.S. Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. **Rev Bras Méd**, v. 10, p. 482-91, 1953.

LEVITUS, G. *et al.* Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. **Clin Exp Immunol**, v. 85, p. 413-17, 1991.

LIMA, M.M. *et al.* Left ventricular diastolic function and exercise capacity in patients with Chagas cardiomyopathy. **Echocardiography**, v. 27, p. 519-24, 2010.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Morte súbita em área endêmica da doença de Chagas. **Rev Soc Bras Med Trop**; v. 16, p. 79-84, 1983.

MAGUIRE, J.H. *et al.* Cardiac morbidity and mortality due to chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a brazilian community. **Circulation**, v. 75, n. 6, p. 1140-5, Jun, 1987.

MAGUIRE, J.H. *et al.* Electrocardiographic classification and abbreviated lead system for population-based study of Chagas' disease. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 16, p. 47–58, 1982.

MARIN-NETO, J.A. *et al.* Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. **Arq Bras Cardiol**, v. 79, n. 6, p. 623-7, Dec. 2002.

MARIN-NETO, J.A.; SIMÕES, M.V.; SARABANDA, A.V. Chagas' heart disease. **Arq Bras Cardiol**, v. 72, n. 3, p. 247-80, Mar. 1999.

MARTIN, D.L. *et al.* CD8+ T-cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant trans-sialidase epitopes. **PLoS Pathog**, v. 2, p. e77, 2006.

MARTINEZ FILHO, O.R. *et al.* Estudio de la función diastólica ventricular izquierda en pacientes com enfermedad de Chagas. **Arq Bras Cardiol**, v. 47, p. 31-36, 1986.

MARTINS, G.A. *et al.* CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**, v. 6, n. 13, p. 1133-44, nov, 2004.

MCCABE, R.E. *et al.* Enhancement of resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by recombinant IFN- $\gamma$ . In: BYRNE, G.; TURCO, J. **Interferon and nonviral pathogens**, p. 203-216, 1988.

MCCABE, R.E.; MEAGHER, S.G.; MULLINS, B.T. Endogenous IFN- $\gamma$ , macrophage activation and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Infect Disease**, v. 163, p. 912-15, 1991.

MENEZES, C.A. *et al.* Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. **Clin Exp Immunol**, v. 137, n. 1, p. 129-38, Jul, 2004.

MOCELIN, A.O. *et al.* The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. **Eur J Heart Fail**, v. 7, n. 5, p.869-73, Aug. 2005.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-91, Jul. 2003.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, suppl 1, p. 17-30, Jul. 2009.

MOTA, E.A. *et al.* A nine year prospective study of Chagas' disease in a defined rural population in northeast Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 42, n. 5, p. 429-40, May. 1990.

MUNÓZ-FERNÁNDEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-  $\alpha$  and interferon- $\gamma$  on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. **Eur J Immunol**, v. 22, p. 301-307, 1992.

NABORS, G.S.; TARLETON, R.L. Differential control of IFN- $\gamma$  and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol**, v. 146, p. 3591-98, 1991.

NEW YORK HEART ASSOCIATION. NYHA. Criteria Committee. **New York Heart Association**. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. 8th ed. Boston: Little, Brown 1979.

NUNES, M.C.P. *et al.* Left atrial volume provides independent prognostic value in patients with chagas cardiomyopathy. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 22, p. 82-8, 2009.

NUNES, M.C.P. *et al.* Morphofunctional characteristics of the right ventricle in Chagas' dilated cardiomyopathy. **Int J Cardiol**, v. 94, p. 79-85, 2004.

NUNES, M.C.P. *et al.* Predictors of mortality in patients with dilated cardiomyopathy: relevance of Chagas disease as an etiological factor. **Rev Esp Cardiol**, v. 63, p. 788-97, 2010.

NUNES, M.C.P. *et al.* Right ventricular dysfunction is an independent predictor of survival in patients with dilated chronic Chagas cardiomyopathy. **Int J Cardiol**, v. 127, p. 372-79, 2008.

NUNES, M.C.P.; BARBOSA, M.M.; ROCHA, M.O. Peculiar aspects of cardiogenic embolism in patients with Chagas' cardiomyopathy: a transthoracic and transesophageal echocardiographic study. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 18, n. 7, p. 761-7, Jul. 2005.

OLIVEIRA, B.M. *et al.* Correlation between BNP levels and Doppler echocardiographic parameters of left ventricle filling pressure in patients with Chagasic cardiomyopathy. **Echocardiography**, v. 26, p. 521-7, 2009.

OLIVEIRA, J.S. *et al.* Apical aneurysm of chagas's heart disease. **Br Heart J**, v. 46, n. 4, p. 432-7, Oct, 1981.

OMMEN, S.R. *et al.* Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: a comparative simultaneous Doppler catheterization study. **Circulation**, v. 102, p. 1788-94, 2000.

ORTIZ, J. *et al.* Segmental contractility changes in the indeterminate form of Chagas' disease. Echocardiographic study. **Arq Bras Cardiol**, v. 49, n. 4, p. 217-20, Oct. 1987.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de Bioestatística**. 2. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004. 506 p.

PAZIN-FILHO, A. *et al.* Left ventricular global performance and diastolic function in indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 20, n. 12, p. 1338-43, Dec. 2007.

PAZIN-FILHO, A. *et al.* Minor segmental wall motion abnormalities detected in patients with Chagas' disease have adverse prognostic implications. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 4, p. 483-87, Apr. 2006.

PÉREZ-FUENTES, R. *et al.* Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **Int J Parasitol**, v. 33, n. 3, p. 293-9, Mar. 2003.

PETERSEN, C.A.; BURLEIGH, B.A. Role for interleukin-1b in Trypanosoma cruzi-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4441-47, 2003.

PETERSEN, C.A.; KRUMHOLZ, K.A.; BURLEIGH, B.A. toll-like receptor 2 regulates interleukin-1-dependent cardiomyocyte hypertrophy triggered by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 6974–80, 2005.

PICKER, L.J. *et al.* Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. **Blood**, v. 86, n. 4, p. 1408-19, 1995.

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

RASO, P.; CHAPADEIRO, E.; TAFURI, W.L. Anatomia patológica da cardiopatia crônica. In: Cançado JR, Chuster M, eds. **Cardiopatia chagásica**. Belo Horizonte: Fundação Carlos Chagas, p. 41-53, 1985.

RASSI, A.JR.; RASSI, A.; LITTLE, W.C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol**, v. 23, n. 12, p.883-9, Dec. 2000.

RASSI, A.JR., RASSI, A., LITTLE, W.C.; XAVIER, S.S.; RASSI, S.G.; RASSI, A.G.; RASSI, G.G.; HASSLOCHER-MORENO, A.; SOUSA, A.S.; SCANAVACCA, M.I. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **N Engl J Med**, v. 355, n.8, p.799-808, Aug. 2006.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p.1388-402, 2010.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; RASSI, S.G. Predictors of Mortality in Chronic Chagas Disease: A Systematic Review of Observational Studies. **Circulation**, v. 115, p. 1101-08, 2007.

REED, S.G. *et al.* IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 153, n. 7, p. 3135-40, 1994.

REED, S.G. *In vivo* administration of recombinant IFN- $\gamma$  induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol**, v. 140, p. 4342-47, 1988.

REIS, D.D. *et al.* Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 5, p. 637-44, mai, 1993.

REIS, G.A. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. **Br J Med Biol Res**, v. 44, n. 2, 84-90, 2011.

REIS, M.M. *et al.* An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 83, n. 2, p. 165-72, 1997.

RIBEIRO, A.L.; ROCHA, M.O. Indeterminate form of chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 3, p. 301-14, May-Jun. 1998.

RINCON, L.G.; ROCHA, M.O.; PIRES, M.T.; OLIVEIRA, B.G.; BARROS, V.C; BARROS, M.V.; RIBEIRO, A.L. Clinical profile of Chagas and non-Chagas' disease patients with cardiac pacemaker. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 3, p. 245-9, May-Jun. 2006.

ROCHA, M. O. Avaliação médico-trabalhista na cardiopatia chagásica crônica. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 27 (Supl. II), p. 50-52, 1994.

ROCHA, M.O.; NUNES M.C.; RIBEIRO, A.L. Morbidity and prognostic factors in chronic chagasic cardiopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 (Supl 1), p.159-66, Jul. 2009.

ROCHA, M.O.; RIBEIRO, A.L.; TEIXEIRA, M.M.. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. **Front. Biosci**, v. 8, p. e44–e54, 2003.

ROCHA, M.O.; TEIXEIRA, M.M.; RIBEIRO, A.L. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 5, n. 4, p. 727-43, Aug. 2007.

RODRIGUES, J.R.V. *et al.* Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 29-37, 2008.

RODRIGUES, M.M.; OLIVEIRA, A.C.; BELLIO, M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. **J Parasitol Res**, 507874, 2012.

RODRIGUEZ-SALAS, L.A.; KLEIN, E.; ACQUATELLA, H.; CATALIOTI, F.; DAVALOS, V.; GOMEZ-MANCEBO, J.R; GONZALEZ, H.; BOSCH, F.; PUIGBO, J.J. Echocardiographic and clinical predictors of mortality in chronic Chagas' Disease. **Echocardiography**, v. 15, n. 3, p. 271-78, 1998.

ROTTENBERG, M.E. *et al.* Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect Immun**, v. 61, n. 12, p. 5129-33, dez, 1993.

ROTTENBERG, M.E. *et al.* Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand J Immunol**, v. 28, n. 5, p. 573-82, Nov. 1988.

SAHN, D.J. *et al.* Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, v. 58, n. 6, p.1072-83, 1978.



SAMUEL, J.; OLIVEIRA, M.; CORREA DE ARAUJO, R.R.; NAVARRO, M.A.; MUCCILLO, G. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. **Am J Cardiol**, v. 52, n.1, p.147-51, 1983.

SANTOS, P.V. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4 (High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. **Microbes Infect**, v. 3, n. 12, p. 971-84, Oct. 2001.

SANTOS, R.R. *et al.* Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Exp Med**, v. 175, n. 1, p.29-39, jan, 1992.

SCHMUNIS, G. Enfermedad de chagas en un mundo global. In: SILVA, J. (ed.). **La enfermedad de Chagas, a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral**. Washington DC: Fundación Mundo Sano, p. 251-255, 2007.

SCHMUNIS, G.A.; ZICKER, F.; MONCAYO, A. Interruption of Chagas' disease transmission through vector elimination. **Lancet**, v. 348, n. 9035, p.1171, Oct, 1996.

SILVA, J.S. *et al.* Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med**, v. 175, p. 169-174, 1992.

SILVA, J.S. *et al.* Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon activated macrophages. **Infect Immun**, v. 63, p. 4862-67, 1995.

SILVA, C.P. *et al.* Why do patients with chagasic cardiomyopathy have worse outcomes than those with non-chagasic cardiomyopathy? **Arq Bras Cardiol**, v. 91, p. 358-62, 2008.

SIQUEIRA, A.L., TIBÚRCIO, J.D. **Estatística na área de saúde: conceitos, metodologia, aplicações e prática computacional**. 1. ed. Belo Horizonte. *Coopmed*, p. 97-99, 2011. 538 p.

SKINNER, H. A. *et al.* Identification of alcohol abuse using laboratory tests and a history of trauma. **Ann Intern Med**, v. 101, n. 6, p. 847-51, Dec. 1984.

SOARES, M.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An Acad Bras Cienc**, v. 73, n. 4, p. 547-59, Dec. 2001.

SOARES, M.B.; SANTOS, R.R. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, (Supl 1), p. 257-62, 1999.

SOUZA, A.P. *et al.* Absence of interferon-gamma-inducible gene IGTP does not significantly alter the development of chagasic cardiomyopathy in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain). **J Parasitol**, v. 89, n. 6, p. 1237-9, Dec. 2003.

SOUZA, P.E. *et al.* Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5283-91, Sep. 2004.

SOUZA, P.E. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infect Immun**, v. 75, n. 4, p. 1886-94, Apr. 2007.

SPEARMAN, C.E. Proof and measurement of association between two things. **Am J Psychol**, v. 15, n. 1, p. 72-101, 1904.

SPURRIER, J.D. On the null distribution of the Kruskal-Wallis statistic. **J Nonparamet Stat**, v. 15, n. 6, p. 685-691, 2003.

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. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 60, p. 25-32, 2008.

STORINO, R. *et al.* Evolucion natural y estudios longitudinales. *In*: Storino RA, Milei J (eds) **Enfermedad de Chagas**. Intermédica, Buenos Aires, p. 593-604, 1994.

SUNI, M.A.; PICKER, L.J.; MAINO, V.C. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. **J Immunol Methods**, v. 212, n. 1, p. 89-98, 1998.

TAFURI, W.L.; LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Estudo morfológico e quantitativo do núcleo dorsal do vago e hipoglosso em chagásicos crônicos com e sem megaesôfago. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 11, p. 123-9, 1969.

TARLETON, R.L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v. 144, n. 2, p. 717-24, Jan. 1990.

TARLETON, R.L. *et al.* Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 338-40, Mar. 1992.

TEIXEIRA, A.R. *et al.* Chagas disease. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 974, p. 788-98, Dec. 2006.

TRIOLA, M.F. **Introdução à estatística**. 10. ed. Rio de Janeiro. LTC, 2011. 696 p.

TEICHHOLZ, L. E. *et al.* Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. **Am J Cardiol**, v. 37, n. 1, p. 7-11, Jan. 1976.

TORRICO, F. *et al.* Endogenous IFN- $\gamma$  is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Immunol**, v. 146, p. 3626-32, 1991.

VAGO, A.R. *et al.* Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1805-9, May. 2000.

VAN VOORHIS, W.C.; EISEN, H.F. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. **J Exp Med**, v. 169, p. 641-652, 1989.

VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.R. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*- induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. **Infect. Immun**, v. 62, p. 5177-82, 1994.

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C. Chagas disease in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, (Supl 2), p. 7-12, 2000.

VIOTTI R, VIGLIANO C, LOCOCO B, PETTI M, BERTOCCHI G, ALVAREZ MG, ARMENTI A. Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progression. **Rev Esp Cardiol**, v. 58, n. 9, p. 1037-44, Sep. 2005.

VITELLI-AVELAR, D.M. *et al.* Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clin Exp Immunol**, v. 145, n. 1, p. 81-92, Jul. 2006.

VITELLI-AVELAR, D.M. *et al.* Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+CD16-CD56+ natural killer T cells and CD4+CD25High regulatory T lymphocytes. **Scand J Immunol**, v. 62, n. 3, p. 297-308, Sep. 2005.

VITELLI-AVELAR, D.M. *et al.* Strategy to assess the overall cytokine profile of circulating leukocytes and its association with distinct clinical forms of human Chagas disease. **Scand J Immunol**, v. 68, n. 5, p. 516-25, Nov. 2008.

WANG, M. *et al.* Peak early diastolic mitral annulus velocity by tissue Doppler imaging adds independent and incremental prognostic value. **J Am Coll Cardiol**, v. 41, p. 820-6, 2003.

WOOD, J.N. *et al.* A monoclonal antibody defining antigenic determinat on subpopulation of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. **Nature**, v. 296, p. 34-38, 1982.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J Infect Dis**, v. 180, n. 2, p. 480-6, Aug. 1999.

## ANEXOS E APÊNDICES

### Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0502.0.203.000-11

Interessado(a): **Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha**  
Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina - UFMG

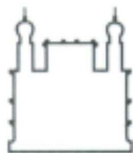
#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de novembro de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "**Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Prof. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG

## Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqRR/FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética



### CARTA DE APROVAÇÃO Nº 01/2012 – CEP / CPqRR / FIOCRUZ / MS

Protocolo CEP - CPqRR nº: 15/2011

**Projeto de Pesquisa:** *"Identificação de marcadores imunológicos associados com a disfunção cardíaca na doença de Chagas".*

**Pesquisadora Responsável:** Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

**Instituição Realizadora:** Centro de Pesquisa René Rachou

Após submissão e análise criteriosa das pendências emitidas no parecer emitido em 27 de setembro de 2011, no Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 196/96 CNS, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR / FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições à ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela homologação das alterações no projeto de pesquisa proposto.

Situação: **APROVADO.**

Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios parciais e final.

Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Belo Horizonte, 19 de janeiro de 2012.



  
João Carlos Pinto Dias  
Coordenador do CEP/SH-CPqRR

## Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (grupo-caso)



**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:**  
**INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
 Belo Horizonte – MG - CEP 30130-100  
 Fone: (031) 3409-9641 FAX: (31) 3409-9642



**UFMG**

Linha de Pesquisa: Fatores determinantes de morbidade e prognóstico na cardiopatia chagásica crônica.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO-CASO

#### Projeto de Pesquisa

**TÍTULO:** Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica e, antes de aceitar, é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

#### **Descrição da pesquisa**

**OBJETIVOS:** o estudo tem como objetivo avaliar os mecanismos imunológicos presentes em pacientes chagásicos, auxiliando na compreensão do aparecimento das lesões e da evolução da doença e, conseqüentemente, no manejo clínico dos pacientes.

**DESCRIÇÃO DO ESTUDO:** será colhida pequena amostra de sangue (20 mL) em tubos estéreis. Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença.

**BENEFÍCIOS:** os participantes terão seu estado imunológico avaliado por hemograma e outros exames a serem realizados. Além disso, a participação neste estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença de Chagas, podendo colaborar para a melhoria do tratamento dessa doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os indivíduos não chagásicos saudáveis que constituirão o grupo-controle.

**RISCOS EM POTENCIAL:** os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da retirada do sangue; no entanto, a coleta será realizada por profissional enfermeiro treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

**PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE):** todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário do paciente e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

**CONFIDENCIALIDADE:** os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, o orientador da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do CPqRR-FIOCRUZ.

**DESLIGAMENTO:** sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

**EQUIPE RESPONSÁVEL:**

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG) – 3409-9547

Coordenadora adjunta: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (UFMG) – (31) 3409-3006

Colaborador: Giovane Rodrigo de Sousa – (31) 9208-1702

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com o Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas-feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6.627 Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005, *Campus* Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil CEP 31270-901 ou pelo telefone (31) 3409.4592 ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone (31) 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

**CONSENTIMENTO:** com base no exposto, estou ciente de que a minha participação é voluntária e será restrita à doação de amostras de sangue. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em doença de Chagas do CTR-DIP.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Ass. do paciente ou responsável:

Ass. da testemunha:

Ass. do orientando

Ass. do pesquisador responsável (orientador)



## Apêndice B - Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE (Grupo controle)



**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:**  
**INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533  
 Belo Horizonte – MG - CEP 30130-100  
 Fone: (031) 3409-9641 FAX: (31) 3409-9642



**UFMG**

Linha de Pesquisa: Fatores determinantes de morbidade e prognóstico na cardiopatia chagásica crônica.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO-CONTROLE

#### Projeto de Pesquisa

**TÍTULO:** Associação da expressão fenotípica de marcadores imunológicos com a morbidade cardíaca na doença de Chagas.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica e, antes de aceitar, é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

#### **Descrição da pesquisa**

**OBJETIVOS:** o estudo tem como objetivo avaliar os mecanismos imunológicos presentes em pacientes chagásicos, auxiliando na compreensão do aparecimento das lesões e da evolução da doença e, conseqüentemente, no manejo clínico dos pacientes.

**DESCRIÇÃO DO ESTUDO:** será colhida pequena amostra de sangue (20 mL) em tubos estéreis. Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença. No seu caso, em particular, você faz parte do chamado “grupo-controle”, isto é, paciente sem história de ter contraído doença de Chagas e com exame de sangue negativo para essa doença.

**BENEFÍCIOS:** os participantes terão seu estado imunológico avaliado por hemograma e outros exames a serem realizados. Além disso, a participação neste estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na doença de Chagas, podendo colaborar para a melhoria do tratamento dessa doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os dos indivíduos não chagásicos saudáveis que constituirão o grupo-controle.

**RISCOS EM POTENCIAL:** os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da retirada do sangue; no entanto, a coleta será realizada por profissional enfermeiro treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

**PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE):** todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

**CONFIDENCIALIDADE:** os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, o orientador da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do CPqRR-FIOCRUZ.

**DESLIGAMENTO:** sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

**EQUIPE RESPONSÁVEL:**

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG) – 3409-9547

Coordenadora adjunta: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (UFMG) – (31) 3409-3006

Colaborador: Giovane Rodrigo de Sousa – (31) 9208-1702.

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com o Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas-feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6.627 Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005 *Campus* Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil CEP 31270-901 ou pelo telefone (31) 3409 4592 ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone (31) 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

**CONSENTIMENTO:** com base no exposto, estou ciente de que a minha participação é voluntária e será restrita à doação de amostras de sangue. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em doença de Chagas do CTR-DIP.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Ass. do paciente ou responsável:

Ass. da testemunha:

Ass. do orientando

Ass. do pesquisador responsável (orientador)