

JAMILLE FERNANDES LULA

**Níveis plasmáticos de TNF-alfa, TRAIL e FasLigante/CD95L
correlacionados com a disfunção ventricular em pacientes
com cardiopatia chagásica crônica**

OURO PRETO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JAMILLE FERNANDES LULA

**Níveis plasmáticos de TNF-alfa, TRAIL e FasLigante/CD95L
correlacionados com a disfunção ventricular em pacientes
com cardiopatia chagásica crônica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários

ORIENTADOR: PROF. ANDRÉ TALVANI

Laboratório de doença de Chagas
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Ouro Preto
2008

“De tudo só ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que é preciso continuar
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar
Portanto devemos
Fazer da interrupção um novo caminho
Da queda, um passo de dança
Do medo, uma escada
Do sonho, uma ponte
Da procura, um encontro.”
Fernando Pessoa

II

Aos meus maravilhosos pais, Luzia e Ina, e irmãos, Wilker e Welder, pelo apoio nos momentos mais difíceis desta caminhada e pelo amor incondicional, que me confortou por inúmeras vezes.

Ao meu esposo Vítor, pelo apoio, amor, incentivo quando eu mais precisava e acima de tudo pela compreensão.

Amo muito vocês!!!!

**Aos meus amados filhos, João Vítor:
minha fortaleza e alegria para suportar
as dificuldades e a imensa saudade
sentida... Agora ao meu filho Pedro: que
mesmo sem saber me propiciou
determinação para concluir este
trabalho. Meus amores, minha vida!**

Ao Meu Deus, autor, princípio e fim de todas as coisas, luz para os meus passos, razão do meu viver. Foi o Senhor quem me trouxe até aqui....

Ao Prof. André Talvani, a quem admiro muito, obrigada pela confiança e pelo empenho despendido para que tudo desse certo. Você esteve presente em um momento muito difícil e fez toda a diferença, com o seu coração gigante. Obrigada por tudo! Eterna gratidão....

A todos os professores do NUPEB, em especial a Profa. Maria Terezinha Bahia pelo grande apoio científico na realização deste trabalho.

À querida Cida, pessoa maravilhosa, que com muito carinho, atenção e alegria sempre pronta a nos atender.

Aos meus colegas de mestrado, em especial, Raquel, Fernanda, Roberta, Fabiane.

À querida amiga Jáila, a qual foi peça chave para enfrentar os obstáculos vividos.

Ao meu querido amigo Auffy por estar presente nos momentos de angústia, sempre pronto a alegrar. Obrigada pelo carinho com meu filho! Minha gratidão...

A todos os alunos do Laboratório de Parasitologia, em especial a Marcela, Lílian Santos, Ivo, Jaqueline, Lílian, Arnaldo, Dany, Lívia pela amizade e pelos intensos momentos de alegria e descontração vividos.

Ao Dr. Pedro Albajar Viñas, pela oportunidade de compartilhar de seus conhecimentos, que muito acrescentaram e pelos conselhos sempre valiosos. Minha grande estima.

À Dra. Rosália Torres pela agradável companhia nas viagens, amenizando os longos dias distantes da família.

Às professoras da Escolinha Dó-Re-Mi por todo amor e carinho oferecidos ao meu filho, que, com certeza, ultrapassaram aos atendimentos de um aluno. Vocês supriram os momentos em que tive de estar ausente para a realização deste trabalho. Minha eterna gratidão.

À família de Vovó Gracinha, Tia Daniela e Tia Fernanda, vocês representam todo o aconchego do lar que meu filho precisava. Obrigada pelo apoio, amor e dedicação que foram extensivos a um neto. Serei eternamente grata.

Às alquimistas por toda amizade, aconchego e feliz convivência em mais uma etapa.

Aos colegas do Laboratório de Patologia: Nádía, Juliana, Amanda e Paula pelos momentos compartilhados.

Agradeço de coração àquelas que contribuíram com meu crescimento profissional, ensinando e repassando seus sábios conhecimentos. Agradeço àquelas pessoas que contribuíram com este trabalho de alguma forma. E agradeço àquelas que, mais que tudo, torceram por mim, sofreram com os problemas enfrentados, ajudaram com pequenos e grandes gestos, riram nos momentos de descontração e amizade. E, souberam confortar nos momentos de fragilidade. Obrigada a todos vocês!!!

Apoptose de cardiomiócitos tem sido reportado estar envolvido na patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC). Para determinar se a maquinaria apoptótica está correlacionada aos distúrbios arrítmicos ventriculares e funcionais na CCC, foi examinado os ligantes da superfamília do TNF (TNF-alfa, Fasligante/CD95L e TRAIL), quanto a sua capacidade de ativar o receptor da via de morte, no plasma de indivíduos chagásicos com insuficiência cardíaca tanto branda e grave quanto de indivíduos não-infectados correlacionando clinicamente (ecocardiografia e eletrocardiografia) em relação aos dados bioquímicos. A concentração de TNF-alfa e TRAIL foi claramente aumentada somente nos indivíduos com a forma grave de CCC enquanto Fas ligante/CD95L foi detectada em todos os indivíduos com doença de Chagas. Todos os ligantes de TNF apresentaram baixas concentrações no plasma de indivíduos de voluntários não-infectados pelo parasito *Trypanosoma cruzi*. Uma boa correlação foi encontrada entre TNF-alfa ($r=0.85$ e $r=0.68$) ou TRAIL ($r=0.68$ e $r=0.60$) e os parâmetros funcionais ventriculares como fração de ejeção ventricular esquerda (LVEF) e diâmetro diastólico ventricular esquerdo (LVDD), respectivamente. Apesar da sensibilidade destes, Fas ligante/CD95L apresentou uma fraca correlação ($r=0.50$) para ambos LVEF e LVDD. Curiosamente, os ligantes da superfamília do TNF foram mais correlacionados somente com os parâmetros funcionais, mas não com eventos arrítmicos. Mais estudos são necessários ainda, mas juntos nossos dados sugerem uma participação de eventos apoptóticos em distúrbios funcionais do ventrículo esquerdo durante a CCC e uma intervenção precoce na via de apoptose poderá preservar alguns parâmetros funcionais cardíacos durante a doença de Chagas crônica.

Palavras-chaves: apoptose – cardiomiopatia chagásica – TNF-alfa – TRAIL – Fas ligante

Apoptosis of cardiomyocytes has been reported to be involved in the pathogenesis of human chronic Chagas cardiomyopathy (CCC). To determine whether the apoptotic machinery is correlated with the ventricular arrhythmogenic and functional disturbances in CCC, we examined the TNF superfamily ligands (TNF- α , Fas ligand/CD95L and TRAIL), by their capacity to activate death receptor pathway, in plasma from chagasic individual with mild and severe heart failure as well as in non-infected subjects correlating clinical (echocardiography and electrocardiography) and biochemical data. The concentration of TNF- α and TRAIL was clearly augmented only in individuals with severe form of CCC while Fas ligand/CD95L was more sensitive to be detected in all individuals with Chagas disease. All TNF ligands presented low concentrations in plasma from voluntaries non-infected by the parasite *Trypanosoma cruzi*. A good correlation was found among TNF- α ($r=0.85$ and $r=0.68$) or TRAIL ($r=0.68$ and $r=0.60$) and the functional ventricle parameters like left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricle diastolic diameter (LVDD), respectively. Notwithstanding its sensitivity, Fas ligand/CD95L presented a weak correlation ($r=0.50$) for both LVEF and LVDD. Interestingly, TNF superfamily ligands were more correlated only with functional parameters, but not with arrhythmogenic events. More studies are still necessary, but together our data suggest a participation of apoptotic events in left ventricle functional disturbances during CCC and an early intervention in the apoptosis pathway could preserve some cardiac functional parameters during chronic Chagas disease.

Keywords: apoptosis – Chagas cardiomyopathy – TNF- α – TRAIL – Fas ligand

Tabela I - Distribuição do grupo de estudo.....26

Tabela II - Ausência de correlação entre o TNF-alfa e parâmetros cardíacos.....33

Tabela III - Variáveis sem correlação entre o TRAIL e algumas funções cardíacas....35

Tabela IV - Variáveis sem correlação entre o Fasligante e algumas funções cardíacas.....37

Figura 1 – Fração de ejeção ventricular esquerda em pacientes portadores da cardiopatia chagásica crônica.....	27
Figura 2 – Diâmetro diastólico ventricular esquerdo em indivíduos portadores da cardiopatia chagásica crônica.....	28
Figura 3 – Extra-sístole ventricular em indivíduos portadores da cardiopatia chagásica crônica.....	29
Figura 4 – Frequência cardíaca máxima em indivíduos chagásicos apresentando a cardiopatia chagásica crônica.....	30
Figura 5 – Correlação entre o TNF-alfa plasmático e os parâmetros funcionais cardíacos na doença de Chagas.....	32
Figura 6 – Correlação entre o TRAIL solúvel e parâmetros funcionais da cardiopatia chagásica crônica.....	34
Figura 7 - Correlação entre o Fas ligante plasmático e os parâmetros funcionais cardíacos na doença de Chagas.....	36

- ANOVA** – Análise de variância
- APO-1/CD95** - Fas
- APO-2L** - TRAIL
- BIRD** - Bloqueio Incompleto do Ramo Direito
- BAV** - Bloqueio Átrio-ventricular
- BAVT** - Bloqueio Átrio-Ventricular Total
- BCRE** - Bloqueio Cardíaco do Ramo Esquerdo
- BDAS** - Bloqueio Divisional Antero-Superior
- CCC** – Cardiopatia Chagásica Crônica
- CTR-DIP** – Centro de treinamento e referência em doenças infecciosas e parasitárias
- DNA**- Ácido desoxirribonucléico
- DVED** - Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
- ECG** – Eletrocardiograma
- ECO** - Ecocardiografia
- ELISA** – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- ESV** - Extra-sístoles ventriculares
- ESSV** – Extra-sístoles supra-ventriculares
- FA** - Fibrilação Atrial
- FasL** – Fas ligante
- FC** – Frequência Cardíaca
- FCI** – Forma Crônica Indeterminada
- FCm** – Frequência Cardíaca Máxima
- FE** – Fração de ejeção
- FEV** - Fração de ejeção ventricular esquerda
- GPI** - glicoproteínas
- HAI** – Hemaglutinação Indireta
- HBAE** - Hemibloqueio Anterior Esquerdo
- IFN- γ** – Interferon-gama
- K⁺** - Potássio

- RIF** – Reação de Imunofluorescência
- ICT** - Índice cardíaco-torácico
- IL-4** - Interleucina-04
- IL-10** - Interleucina-10
- IL -12** – Interleucina-12
- LTB4** – Leucotrieno B4
- Na⁺** - Sódio
- NI** - Não infectado
- NYHA** – *New York Heart Association*
- NK** - *Natural Killer*
- NO** – Óxido nítrico
- OD** – Densidade Ótica
- Omi/HtrA2** – Serina protease mitocondrial proapoptótica dependente de caspase
- OPAS** – Organização Pan- Americana de Saúde
- SEM** – erro padrão
- SRAA** - Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona
- STAT 1** – *Signal transducer and activator of transcription 1*
- PAF** - Fator de ativação plaquetária
- PCR** – *polymerase chain reaction*
- SIDA** – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- SNA** – Sistema Nervoso Autônomo
- Th-1** – T helper tipo 1
- Th-2** – T helper tipo 2
- TLR** – *Toll Like Receptor*
- TNF- α** – Fator de necrose tumoral- alfa
- TNFR** – Receptor para o TNF

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VE – Ventrículo Esquerdo

VeD - Diâmetro diastólico ventricular esquerdo

VO₂ MAX – Volume máximo de oxigênio

WHO – World Health Organization

DEDICATÓRIA	II
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	2
1.2 Forma Clínica da Doença de Chagas.....	4
1.2.1 Fase Aguda da doença de Chagas.....	4
1.2.2 Fase crônica da doença de Chagas.....	4
1.2.3 Fase crônica assintomática.....	5
1.2.4 Fase crônica sintomática.....	6
1.3 Resposta Imune na Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC).....	10
1.4 Eventos apoptóticos.....	13
1.4. 1 Eventos apoptóticos na cardiopatia chagásica.....	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
3.1 Delineamento Experimental.....	19
3.2 Critérios para seleção dos pacientes.....	20
3.3 Avaliação Clínica.....	20
3.4 População de estudo.....	21
3.5 Ensaios Imunoenzimáticos.....	21

3.5.1 Dosagem plasmática de TNF- α	23
3.5.2 Dosagem plasmática de TRAIL.....	23
3.5.3 Dosagem plasmática de Fas ligante.....	23
3.6 Análise Estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1 População estudada	26
4.2 Análise de correlação entre formas clínicas e disfunções cardíacas.....	27
4.2.1 Fração de Ejeção ventricular esquerda.....	27
4.2.2 Diâmetro diastólico ventricular esquerdo.....	28
4.2.3 Extra-sístoles ventriculares.....	29
4.2.4 Frequência Cardíaca Máxima.....	30
4.3 Avaliação do TNF-alfa plasmático e suas correlações com as funções ventriculares esquerdas.....	31
4.4 Análise das variáveis de funcionalidade cardíaca associadas ao TRAIL solúvel.....	33
4.5 Análise das variáveis de funções cardíacas para o FasLigante na doença de Chagas.....	35
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemoflagelado pertencente à família *Tripanosomatidae*, foi descoberto por Carlos Justiniano das Chagas em 1909, quando descreveu este parasito caracterizando-o como causador de uma moléstia que, posteriormente, receberia seu nome. Esse pesquisador não apenas identificou o agente etiológico da infecção, como também seu vetor, os insetos da família Reduviidae e seus reservatórios naturais descrevendo ainda, naquele momento, algumas das principais manifestações clínicas da doença (Chagas, 1909; 1911).

Àquela época, Carlos Chagas já observara que o principal elo da cadeia epidemiológica da doença seria o inseto vetor e que sua eliminação poderia interromper a transmissão da infecção. Em seu trabalho, Chagas sugeriu que o controle da transmissão seria a melhor estratégia e também a mais difícil de ser alcançada na luta contra a doença (Chagas 1909; 1911).

Acredita-se que as primeiras infecções humanas pelo *Trypanosoma cruzi* teriam ocorrido há pelo menos 4.000 anos antes de Cristo após a descoberta de DNA do parasito em múmias Andinas (Guhl et al, 1997). O provável contato de reservatórios infectados com triatomíneos adaptados às moradias humanas primitivas teria contribuído para o surgimento dos primeiros casos de doença de Chagas em seres humanos e, ainda hoje, a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* acontece desde o norte dos Estados Unidos até o sul da Argentina, sendo responsável por uma das mais graves doenças parasitárias das Américas com grandes impactos econômicos (Dias & Schofield, 1999).

Na década passada, a implantação de medidas de controle vetorial em muitas áreas endêmicas levou a uma redução na transmissão vetorial, pelo *Triatoma infestans*, proporcionando um decréscimo substancial na incidência da doença de Chagas na América Latina (Moncayo, 2003 e WHO, 2002). Em 09 de junho de 2006 a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) presenteou o Ministério da Saúde do Brasil com o certificado Internacional de Eliminação da Transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, principal espécie transmissora (Massad, 2007).

Outro mecanismo de transmissão, responsável por aproximadamente 10% dos casos, é a transfusão sanguínea. O risco de adquirir a infecção através de transfusão sanguínea de um doador infectado é de aproximadamente 20% (Schmunis, 1999). Já a terceira rota de transmissão é a congênita, a qual pode ocorrer também fora de áreas endêmicas (Prata, 2001). Além destas, a transmissão oral através de alimentos contaminados como caldo de cana e suco de açaí, tem sido descritas, especialmente na região amazônica (Coura JR et al., 1994) e mais recentemente nos estados brasileiros de Santa Catarina (SVS/MS, 2006) e Ceará (Dias, 2006), gerando microepidemias da doença de Chagas aguda. Outros mecanismos esporádicos de transmissão incluem contaminação acidental durante trabalho em laboratório e órgãos transplantados.

Não havendo vacina que previna a infecção, a principal forma de evitar o aparecimento de novos casos reside no controle da transmissão vetorial, transfusional e congênita. Atualmente existem 13 milhões de indivíduos infectados pelo parasito nas Américas Central e do Sul, com incidência anual de 200.000 novos casos e 14.000 mortes em decorrência de danos irreversíveis ao coração e ao trato digestivo (WHO, 2005).

Em 1980, a morbidade do mal de Chagas foi estimada em 1.200.000 pacientes com alterações cardíacas, 10% destes com doenças severas, e menos de 200.000 com megaesôfago e/ou megacólon. No Brasil, em 1980 a mortalidade devido à doença de Chagas foi 5.1 por 100.000 habitantes. Estima-se que 23.000 mortes, devido à doença de Chagas, ocorrem todo ano decorrente da infecção pelo *T. cruzi* e que, na América Latina, somente infecções respiratórias agudas, doenças diarreicas e SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) produzem uma carga socioeconômica maior que a doença de Chagas (Prata, A., 2001).

A infecção pelo *T. cruzi* resulta em uma longa associação parasito-hospedeiro e pode gerar principalmente, inflamação na musculatura cardíaca, dilatação do esôfago ou cólon e anormalidade no sistema nervoso central (Moncayo, 1999).

1.2 Forma Clínica da Doença de Chagas

A doença de Chagas é caracterizada por três fases clínicas distintas: (i) Fase aguda, (ii) Fase crônica assintomática e (iii) Fase crônica sintomática.

1.2.1 Fase Aguda da doença de Chagas

Após um período de incubação de cerca de sete a dez dias, inicia-se a fase aguda da infecção caracterizada pela ausência de sintomatologia em cerca de 98% dos casos e pelos sinais de porta de entrada (sinal de Romana e chagoma de inoculação). Este período que dura em média dois a quatro meses, apresenta parasitemia patente, podendo ocorrer febre e inflamação ganglionar (Rassi et al., 2000). Nesta fase, mais grave em crianças abaixo de dois anos, a mortalidade pode chegar a 10% na ausência do tratamento etiológico (Ribeiro & Rocha, 1998).

Os indivíduos chagásicos, com vários anos de infecção, geralmente não se recordam desta sintomatologia de fase aguda. Isso ocorre devido a uma analogia feita a outras infecções frequentes como a gripe, infecção bacteriana, helmíntica ou mesmo uma resposta inflamatória de cunho inespecífico. E pelo curto período de permanência da fase aguda, estes indivíduos induziam um falso aspecto de eliminação da infecção.

1.2.2 Fase crônica da doença de Chagas

A fase crônica inicia-se após 2-4 meses do desaparecimento das manifestações clínicas agudas. Nesta fase os parasitos tornam-se dificilmente detectáveis na corrente sanguínea, sendo necessário a utilização de métodos indiretos, como xenodiagnóstico (Bronfen et al. 1989), hemocultura (Chiari et al., 1989), sorologia (Luquetti, 1990) ou a técnica direta da reação de cadeia da polimerase- PCR (Jones et al., 1993; Vago et al., 1996) para sua detecção.

Os pacientes podem apresentar diferentes manifestações clínicas, dependentes tanto de fatores inerentes ao parasito quanto ao hospedeiro vertebrado. Os fatores relevantes inerentes ao parasito são: a variabilidade entre as cepas, a virulência, a

antigenicidade, o tropismo celular e o tamanho do inóculo. Em relação ao hospedeiro vertebrado, fatores como idade, sexo e o perfil da resposta imune parecem modular diferenças nas manifestações clínicas (Dias, 2000; Manoel-Caetano & Silva, 2007).

1.2.3 Fase crônica assintomática

A maioria dos indivíduos evolui para a fase crônica e permanece por um longo período em latência clínica, o que caracteriza a forma indeterminada ou assintomática da doença, que pode durar 10-30 anos ou por toda a vida.

O diagnóstico clínico da doença de Chagas se baseia na realização do estudo radiológico de tórax, esôfago, cólon, e de eletrocardiograma (ECG), associados ao exame físico do paciente, especialmente em áreas endêmicas, devido ao seu baixo custo, no entanto sabe-se hoje que exames mais sensíveis são essenciais para o diagnóstico preciso e cada vez mais precoce da doença.

A fase crônica indeterminada inicia-se após quatro a dez semanas, caracterizando-se pela ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas. Em 1985, durante a Primeira Reunião de Pesquisa Aplicada em doença de Chagas, em Araxá, foi estabelecido o conceito de forma indeterminada, classificando aqueles indivíduos com diagnóstico confirmado através de testes sorológicos positivos e exames parasitológicos positivos ou negativos; ausência de sinais e sintomas da doença; estudo eletrocardiográfico normal e estudo radiológico do coração, esôfago e cólon normais como portadores da forma indeterminada (*Brazilian Consensus on Chagas disease*, 2005). Entretanto, quando exames mais sensíveis como o ecocardiograma, a eletrocardiografia dinâmica (Holter), ou mesmo o teste da função autonômica são realizados, é possível verificar que alguns indivíduos, previamente diagnosticados com a forma indeterminada, manifestavam alterações mínimas a estes testes, sendo, portanto, reclassificados com um grau de acometimento cardíaco leve (Rocha et al., 2007). Essas alterações podem ter valor prognóstico evolutivo clínico e, nesses casos, uma intervenção terapêutica diferenciada e/ou uma adaptação ao estilo de vida o paciente devem ser instituídas para impedir a progressão da doença.

Cerca de 27% dos indivíduos infectados, após vários anos na forma indeterminada desenvolverão manifestações cardíacas, 6% evoluirão para forma digestiva e 3% apresentarão comprometimento nervoso periférico (Moncayo, 1999). A forma mista da infecção, compreendida por manifestações cardíacas e digestivas acomete uma pequena proporção dos indivíduos infectados crônicos.

1.2.4 Fase crônica sintomática

As manifestações da forma digestiva da doença de Chagas ocorrem em cerca de 10% dos casos de forma crônica, apresentando dilatações e alterações funcionais principalmente no esôfago e no cólon, devido a lesões no sistema nervoso autônomo intramural, parasitismo tecidual e ação do sistema imune (Tafuri, 1970; Tafuri, 1987; Dias, 1992). Estas alterações caracterizam o megaesôfago e o megacólon chagásicos.

No entanto, a forma cardíaca é a maior causa de morbidade da doença de Chagas manifestando-se em cerca de 30 a 40% dos indivíduos na faixa etária entre 20-50 anos, provavelmente causada pela persistência do parasito e/ou autoimunidade (Gironés et al, 2007). Estes portadores do mal de Chagas podem apresentar prognóstico e evolução clínica variáveis, manifestando desde pequenas alterações eletrocardiográficas até uma insuficiência cardíaca ou até mesmo progredindo para uma eventual morte súbita (Coura et al., 1983; Dias, 1992). Estatísticas extra-oficiais apontam para uma taxa anual de morte súbita em torno de 30.000 casos (Rassi Jr et al., 2001) entre os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* apresentando a chamada cardiopatia chagásica crônica (CCC).

A CCC é caracterizada, do ponto de vista morfológico, por áreas de fibrose substituindo a massa muscular cardíaca ocasionando a interrupção das fibras do coração, destruição do sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático e pela presença de um exsudato inflamatório ativo (Andrade et al., 1984). A hipertrofia, dilatação e alteração da arquitetura do músculo cardíaco induzem ao aumento do tamanho do coração, caracterizando o quadro de cardiomegalia. Em casos avançados de cardiomegalia, fenômenos tromboembólicos são os principais achados patológicos,

além do aneurisma cardíaco apical que é um achado freqüente e patognomônico da CCC (WHO, 2002).

Na CCC observa-se, ainda, alterações ao ECG e ao Raio X de tórax, na maioria das vezes, especialmente nos casos mais avançados, com a manifestação de sintomas físicos (Marin-neto et al., 2000). No entanto, estes exames mais comuns possuem limitações às quais não permitem diagnósticos nas fases iniciais das manifestações clínicas. Exames cardiovasculares mais sofisticados e não invasivos podem revelar anormalidades cardíacas iniciais, possibilitando um manejo clínico mais adequado e precoce de cardiopatas chagásicos crônicos.

Dentre os principais exames necessários para a avaliação complementar na CCC destacam-se: (i) Raio-X de Tórax, (ii) eletrocardiograma, (iii) ecodoplercardiograma, (iv) Holter e (v) teste ergométrico. A seguir, uma breve explanação sobre esses métodos de avaliação clínica:

(i) Raio-X de Tórax: O Raio-X de tórax é de grande importância no manejo dos pacientes com CCC pois, permite uma categorização através da análise do tamanho do coração e da circulação pulmonar. Em fases mais avançadas da cardiopatia chagásica observa-se aumento acentuado da silhueta cardíaca, identificado através da observação do índice cardio-torácico. No entanto, apesar deste método ter grande utilização em hospitais ou mesmo em áreas endêmicas, sabe-se que possui pouca sensibilidade uma vez que somente identifica alterações muito evidentes como consequência de enfermidades já bastante avançadas (Rocha et al, 2003).

(ii) Eletrocardiograma: esse é um método prático e sensível para a detecção, avaliação e acompanhamento da cardiopatia chagásica referente aos aspectos de acometimento do sistema excito-condutor pelo parasito (Guimarães, 1985; Almeida et al., 1985). A presença de alterações eletrocardiográficas constitui elemento fundamental na caracterização de comprometimento cardíaco significativo na doença de Chagas (CONSENSO, 2005; Xavier et al., 2006).

O Consenso Brasileiro em doença de Chagas (2005) considerou, ainda, as seguintes alterações como mais características da doença de Chagas: Bloqueio

Completo de Ramo Direito com ou sem Bloqueio Divisional Antero-Superior (BDAS) ou HBAE- hemibloqueio anterior esquerdo, extra-sístoles ventriculares (ESV), bradicardia sinusal com frequência cardíaca (FC) menor que 40 bpm, bloqueio átrio-ventricular (BAV) de 2^o grau, alterações primárias da onda T, presença de áreas eletricamente inativas, disfunção do nó sinusal, fibrilação atrial (FA), Bloqueio Átrio-Ventricular Total (BAVT) e Bloqueio cardíaco do Ramo Esquerdo (BCRE). As seguintes alterações ao ECG, neste consenso, foram consideradas inespecíficas, se ocorrem de forma isolada: bradicardia sinusal com FC maior que 40 bpm, baixa voltagem, Bloqueio Incompleto do Ramo Direito (BIRD), BDAS, BAV de 1^o grau, alterações inespecíficas de ST-T.

(iii) Ecodopplercardiografia: a ecocardiografia (ECO), um exame que usa ondas de ultra-som para criar imagens do coração, método não invasivo, permite a avaliação dos diâmetros e volumes ventriculares das funções sistólica e diastólica, estudo da contratilidade segmentar, detecção de aneurismas e trombos. Constitui método de extrema importância, pois a disfunção sistólica global do ventrículo esquerdo constitui o principal fator prognóstico na CCC (Marin-neto et al., 1998; Rassi Jr. e Marin-neto, 2000; WHO, 2002; Rocha et al., 2003; Consenso, 2005; Ribeiro et al., 2007).

O ecocardiograma é o exame “padrão ouro” para avaliar a função miocárdica, contudo não se tem até o momento uma classificação consensual que contemple a avaliação da função sistólica ventricular esquerda na CCC à luz da ecocardiografia (Consenso, 2005). É habitualmente realizada pelo uso combinado das técnicas unidimensional, bidimensional e Doppler, completando-se a análise através do mapeamento de fluxo em cores.

A introdução da ecocardiografia bidimensional com Doppler demonstrou novos aspectos ecocardiográficos na forma crônica indeterminada. Foi relatada a incidência elevada de prolapso valvar mitral, discinesia septal, hipocinesia difusa, lesão vorticilar, hipocinesia apical e/ou de paredes posteriores (Acquantella et al., 1980; Pereira-Barreto et al., 1990). Alguns autores (Carrasco et al., 1990; Pererira-Barreto, 1995) descreveram que, dos principais parâmetros utilizados para análise da função sistólica, a fração de ejeção está diminuída proporcionalmente ao grau de

comprometimento miocárdico, o que se correlaciona de modo significativo com a ocorrência de arritmias ventriculares complexas e distúrbios da condução intraventricular e, conseqüentemente, com o mau prognóstico clínico para a doença.

A maioria dos pacientes com CCC apresenta evidências de comprometimento miocárdico segmentar, caracterizado por alteração contrátil da região póstero-apical do ventrículo esquerdo (VE), com relativa preservação do septo interventricular e da parede anterior do VE (Torres, 1998). Ainda, Torres (2004) avaliou 112 pacientes, chagásicos e não chagásicos, com o propósito de estudar os fatores relacionados ao aumento do volume do átrio esquerdo na CCC e concluiu tratar-se de um marcador de comprometimento morfofuncional do ventrículo esquerdo na CCC, relacionando-se com a massa ventricular esquerda, o grau de disfunção diastólica, a fração de ejeção e as alterações contráteis segmentares do ventrículo esquerdo.

(iv) **Eletrocardiografia dinâmica (Holter)**: O Holter é um dos testes não invasivos mais amplamente usados na investigação de arritmias cardíacas em pacientes chagásicos (Marin-neto et al., 2000). Apresenta valor significativo na CCC para a investigação de arritmias em pacientes com sintomas cardiovasculares inexplicados, especialmente palpitações, pré-síncope ou síncope, embora em apenas ¼ dos pacientes sintomáticos o método revele arritmias (Ribeiro, 1998; WHO, 2002). O método tem sido utilizado em estudos pequenos ou em acompanhamento clínico na tentativa de diagnosticar precocemente o dano miocárdico em chagásicos apresentando a forma crônica indeterminada (FCI) (Martins e Franco, 1982).

(v) **Teste ergométrico**: O teste ergométrico na CCC avalia parâmetros clínicos hemodinâmicos e eletrocardiográficos (Rocha et al., 1997) e pode complementar ou representar uma alternativa adequada ao exame de Holter para detecção de arritmias ventriculares durante o exercício. Utilizado para determinação da capacidade funcional, da avaliação da vulnerabilidade e do comportamento de arritmias ao esforço, este exame é realizado segundo protocolos convencionais. A presença de arritmias ventriculares em repouso não contra-indica a sua utilização (Consenso Nacional de Ergometria, 1995).

Através do Teste Ergométrico, também pode ser constatada resposta cronotrópica deficiente ao esforço, resultante de depressão do controle parassimpático sinusal (Rassi Jr. e Marin-Neto, 2000). De fato, o exame físico precoce pode revelar irregularidade do ritmo cardíaco devido a extra-sístoles freqüentes, muitas vezes com bradicardia. Em fases mais avançadas podem ser observados sinais de cardiomegalia com o desvio do *ictus cordis* e sopros típicos de insuficiência funcional das válvulas tricúspide e mitral.

Em conjunto, os eventos fisiopatológicos da CCC podem levar à insuficiência cardíaca em graus variados causando, nesses indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, uma reduzida qualidade ou mesmo expectativa de vida. Por esse motivo a detecção prévia de eventos clínicos ou marcadores que antecedam a evolução clínica permanece uma constante na área médica. Recentemente, a compreensão da interação entre a resposta imune do hospedeiro e o desenvolvimento da CCC tem aberto promissoras linhas de investigação básica e clínica para a doença de Chagas (Ramasawmy et al., 2007).

1.3 Resposta Imune na Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC)

Sabe-se que tanto a ação direta do sistema imune quanto a presença do parasito (ou de seus antígenos) participe ativamente da patogênese inerente à cardiopatia chagásica crônica (Higuchi, 1995; Higuchi et al., 1997; Barbosa et al., 1986; Cunha-Neto et al., 1998; Tarleton, 2001; Silveira et al., 2005). Foi demonstrado uma correlação positiva entre a intensidade de inflamação e a presença do *T. cruzi* no tecido cardíaco, assim como sua ausência em locais sem inflamação (Belloti et al. 1996, Higuchi 1995) e, em contrapartida, outros estudos confirmaram essa relação ao não detectarem sequências do DNA do *T. cruzi* em tecido cardíaco de pacientes assintomáticos ou soronegativos (Jones et al., 1993), sugerindo ser a presença do parasito fator importante para desencadear o processo de formação da miocardite chagásica crônica.

A resposta imune que se segue à infecção pelo *T. cruzi* é bastante complexa, envolvendo o reconhecimento de antígenos do parasito por uma série de receptores de membrana e a ativação de diferentes tipos celulares (Tarleton, 2007). Ao primeiro sinal de infecção, moléculas derivadas do parasito, tais como as GPI-mucinas, são capazes de

estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias, bem como de quimiocinas por macrófagos do hospedeiro (Teixeira *et al*, 2002). Os eventos participantes tanto da resposta imune inata quanto da resposta imune adquirida tornam-se importantes delineadores do curso da infecção pelo *T. cruzi*:

(i) Resposta imune inata.

A resposta imune inata é considerada um fator primordial na resistência do hospedeiro contra o *T. cruzi* na fase inicial da infecção. As células do sistema mononuclear fagocitário são, por excelência, as primeiras células a entrarem em contato com o parasito, seja por fagocitose, seja por penetração direta do parasito. Essas células apresentam reconhecem antígenos do parasito (ex. moléculas de glicofosfatidil-inositol) via receptores do tipo Toll (Tarleton 2007) e iniciam a produção de citocinas como fator de necrose tumoral- alfa (TNF-alfa), interleucina – 12 (IL-12). Essas citocinas promovem uma auto-ativação nos fagócitos induzindo-os a produzir substâncias oxidantes como o óxido nítrico (NO), que levam a destruição do parasito (Silva, 2003).

Também as células *natural killer* (NK) apresentam importante papel ao limitar o crescimento do parasito e estimular o desenvolvimento da resposta imune celular. As células NK são importantes fontes de IFN- γ , citocina relevantes na ativação de células. Dessa forma, tais células são as primeiras fontes de IFN- γ , antes mesmo do desenvolvimento de imunidade mediada por células T. Essa citocina estimula a síntese de IL-12 por macrófagos expostos ao parasito induzindo a diferenciação de células do fenótipo Th1 (Brener & Gazzinelli, 1997; Teixeira et al., 2002; Dutra et al., 2005).

(ii) Resposta imune adquirida

Ainda durante a fase aguda da doença, as células produtoras de anticorpos iniciam uma exacerbada resposta contra o *T. cruzi* e outras células inflamatórias reforçam a produção de citocinas pró- ou anti-inflamatórias iniciadas com a resposta inata contra o parasito. A produção exacerbada de algumas citocinas (IFN-gama, TNF-alfa) poderá desencadear uma inflamação excessiva resultando em danos teciduais para

o hospedeiro (Brener & Gazzinelli, 1997; Bahia-Oliveira *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2001; Dutra *et al.*, 2005). Caminhando para a cronificação da infecção chagásica, sabe-se que o perfil de citocinas tem sido associado à cronificação da inflamação (Fresno *et al.*, 1997; Bahia-Oliveira *et al.*, 1998; dos Santos *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003).

Dados de pacientes portadores de CCC mostram que o perfil de citocinas é representado por citocinas com perfil Th1, semelhante ao IFN- γ e com papel na supressão de citocinas do tipo Th2, como IL-4 (Ribeirão *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001), e níveis elevados de TNF- α no plasma (Ferreira, 2003). Ainda, células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de CCC produzem mais IFN- γ e menos IL-10 (Abel *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003) em relação a pacientes com a forma indeterminada da doença de chagas, reforçando a hipótese de que pacientes com CCC desenvolvem uma resposta imune Th1 exacerbada. Estas observações sugerem que inflamação crônica do miocárdio mediada por IFN- γ pode contribuir para a patogênese da CCC (Bilate & Cunha-Neto, 2008).

Além disso, foi demonstrado altos níveis de TNF- α em pacientes com CCC se comparados com indivíduos apresentando a forma indeterminada da doença (Ferreira *et al.*, 2003; Talvani *et al.*, 2004) e, que células T do infiltrado inflamatório cardíaco de pacientes com CCC produzem predominantemente IFN- γ e TNF- α (Abel *et al.*, 2001), sugerindo que essas citocinas possam funcionar como importantes marcadores de prognóstico clínico para CCC. Ainda, a presença de linfócitos e macrófagos nos infiltrados inflamatórios é diretamente relacionada ao processo de fibrose, tanto pela produção de citocinas e fatores de crescimento, quanto pela fibrogênese (Reis *et al.*, 1997).

Em suma, diversos estudos têm sugerido que a resposta imune do indivíduo contra o parasito é um dos fatores mais importantes para o processo de evolução da doença de Chagas (Dutra *et al.*, 1994; Gomes *et al.*, 2003; Barros-Mazon *et al.*, 2004). Porém, outras especulações mais recente sugerem que parte da resposta lesiva sobre o tecido cardíaco seria consequência de eventos apoptóticos no miocárdio e ainda, que essa apoptose seria induzida pela ativação de algumas citocinas pró-inflamatórias liberadas em resposta ao parasito (Rossi *et al.*, 1999; Tostes Jr. *et al.*, 2005). Haudek *et*

al., 2007 sugere que a inflamação sustentada leva à ativação de múltiplas vias de morte celular que contribui para uma apoptose progressiva de cardiomiócitos.

1.4 Eventos apoptóticos

A apoptose é um processo ordenado de morte celular envolvida em inúmeros processos fisiológicos e patológicos ocorrendo em organismos uni e multicelulares. Apoptose, termo cunhado por Kerr e colaboradores (1972) foi originalmente concebido para classificar células mortas (sob uma variedade de condições) que exibiam características morfológicas sugestivas de um processo ativo não inflamatório de desconstrução celular. Hoje se sabe que é um processo geneticamente regulado que requer gasto de energia, resultando na morte celular em uma remoção imunologicamente silenciosa (Holdenrieder & Stieber, 2004; Green, 2004; Brás et al., 2005). Múltiplas vias de sinalização podem ser deflagradas por diversos estímulos incluindo ambientais, farmacológicos ou fisiológicos, levando a morte da célula. A apoptose pode envolver atividade reguladora e executora em cascata de uma família de cisteína proteases aspartato específicas denominadas de caspases.

As duas principais vias que ativam caspases são: (i) extrínseca, pela ação da perforina/granzima, e/ou seguida pela ligação de um ligante a receptores de morte na superfície celular (como TRAIL, FasL/Fas, TNF- α /TNFR), que resulta na formação do complexo de sinalização indutor de morte celular. Este complexo recruta e ativa caspases 8 e 10 iniciadoras, que clivam e ativam caspases 3, 6 e 7 executoras, responsável pela clivagem de múltiplas proteínas e subsequente morte da célula (Peter & Krammer, 2003) e (ii) intrínseca, iniciada por sinais intracelulares (como dano no DNA), é dependente principalmente da mitocôndria, levando a liberação de proteínas do espaço intermembranar mitocondrial, tais como citocromo c, Smac/DIABLO e Omi/HtrA2.

Bowen & Bowen, em 1990 demonstraram que a apoptose seria induzida por muitos fatores que são liberados de células inflamatórias, incluindo aquelas pertencentes à superfamília do TNF. Neste sentido os membros da superfamília do TNF como Fas/Apo-1 ligante, o TNF-alfa e Apo-2L podem servir como sinais extracelulares de

morte celular programada (Pitti R.M., 1996), os quais agem em vários pontos na resposta imune, da inflamação à morte da célula (Nagata e Golstein, 1995).

A superfamília de receptores de TNF- α inclui membros que se ligam não apenas à citocina TNF- α , como também a outros ligantes clinicamente significativos. Alguns desencadeiam a apoptose (via ativação das caspases), outros iniciam a proliferação celular e outros ainda ambos os processos. Em 2007, Haudek et al. demonstrou que o remodelamento cardíaco em camundongos com superexpressão de TNF secretado restrito ao tecido cardíaco estaria correlacionado com a prevalência de apoptose em cardiomiócitos. Além do TNF-alfa, dois componentes da superfamília do TNF merecem uma breve descrição:

(i) FasLigante/CD95L

As moléculas Fas (*fibroblast associated*) e seu ligante (FasL) foram descobertas no final da década 80 e no começo da década de 90, respectivamente (Yonehara et al., 1989; Itoh et al., 1991). A molécula Fas, também denominada Apo-1/CD95, é expressa na membrana da maioria das células. Em contraste, acredita-se que a expressão de FasL seja restrita a células do sistema imune, principalmente linfócitos T, células NK (natural killer) e monócitos ativados (Takahashi et al., 1994b; Brown et al., 1999). O “*cross-linking*” de Fas com FasL geralmente desencadeia o processo de apoptose na célula que expressa a molécula de Fas (Su et al., 1998). Além da forma de proteína de membrana, Fas e FasL são encontrados em formas solúveis. Fas solúvel é originado por “*splicing*” alternativo do gene de Fas e FasL solúvel e é resultante de clivagem proteolítica por metaloproteinases (Mariani et al., 1995; Ruberti et al., 1996). A molécula de Fas solúvel inibe competitivamente a ligação de FasL com Fas localizado na membrana de células, enquanto que a função de FasL solúvel ainda não está bem esclarecida (Cascino et al., 1995; Otsuki et al. 2000).

(ii) TRAIL

O TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF) foi identificado como membro da superfamília do TNF, sendo identificado capaz de promover apoptose em inúmeras células a partir da ativação de caspase-8 seguida da ativação de caspases efetoras. O TRAIL humano ligado à membrana foi estudado por induzir diversas hepatites em camundongos e sua forma solúvel por induzir apoptose em hepatócitos humanos normais *in vivo* (Ma et al., 2003). Ambas as formas de TRAIL, ligadas à membrana e solúvel, induzem rapidamente apoptose em múltiplas linhagens de células transformadas e células tumorais (Wiley et al., 1995; Masters et al., 1996; Griffith et al., 1998).

1.5. Eventos apoptóticos na cardiopatia chagásica

Na doença de Chagas, a perda das células do miocárdio tem sido classicamente atribuída à morte celular por necrose. Henriques-Pons et al. em 2002, mostraram que apoptose pode ser detectado em coração de camundongo infectado por *T. cruzi* de maneira independente de perforina. Em 2003, Souza et al. mostraram em seus trabalhos apoptose em células cardíacas na infecção *in vivo* com *T. cruzi*, e Tostes Jr. (2007) sugere que a perda de células do miocárdio estariam ocorrendo tanto por fibrose quanto por apoptose, o que contribuiria para a insuficiência cardíaca na fase crônica da doença de Chagas. Teixeira e colaboradores (2006) descreveram, também, uma significativa expressão de stress oxidativo e de proteínas relacionadas à apoptose em tecido cardíaco na CCC, reafirmando a importância da morte celular no processo de patogenia da CCC.

Nos últimos anos, um número crescente de trabalhos têm focado a busca de marcadores inflamatórios para a cardiopatia chagásica (Talvani A. et al., 2004; Ribeiro A.L.P. et al, 2002; Marques et al., 2006; Arques S. et al., 2007 e Melo R.B. et al., 2005), com o objetivo de anteceder, clinicamente ou farmacologicamente, aos eventos de eventos de dano cardiovascular inerentes à doença de Chagas. Considerando, atualmente, os eventos apoptóticos como promotores de fibrose e perda funcional do miocárdio em indivíduos com cardiopatias de outras etiologias (Ibe et al. 2007), surge o questionamento se os eventos de disfunção ventricular, observados na CCC, também não estariam associados à ativação das vias intrínscas da apoptose, principalmente aquelas induzidas pelas moléculas solúveis da superfamília do TNF.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

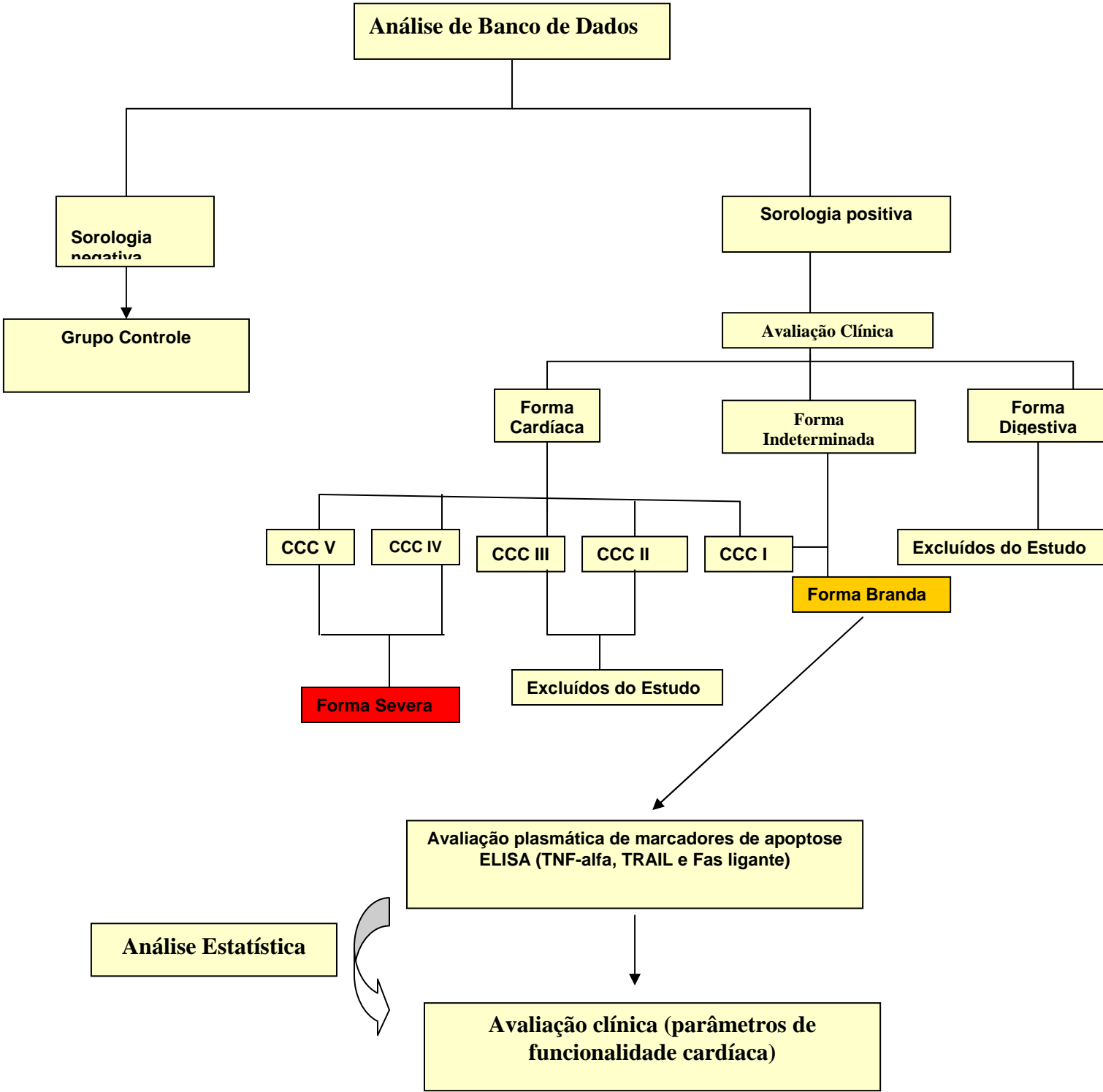
O presente trabalho apresenta como objetivo geral o estabelecimento da correlação clínica entre componentes plasmáticos da superfamília do TNF (ligantes para a via da apoptose) e a disfunção ventricular esquerda em pacientes com cardiopatia chagásica crônica.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Selecionar pacientes chagásicos com formas polares de disfunção ventricular esquerda, segundo classificação proposta por Rocha et al. 2007.
- 2- Determinar, através de ensaios imunoenzimáticos, os níveis plasmáticos de TNF- α ; Fas ligante e TRAIL circulantes.
- 3- Correlacionar os níveis dos marcadores de apoptose com os diferentes graus de disfunção ventricular esquerda dos grupos de indivíduos com cardiopatia chagásica crônica e sem infecção (grupo controle);

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental



3.2 Critérios para seleção dos pacientes

O material biológico utilizado nesse trabalho foi proveniente de pacientes chagásicos do Banco de Dados do Centro de Treinamento e Referência de Doenças Infecciosas e Parasitárias (CTR-DIP), Ambulatório Orestes Diniz, pertencente ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a supervisão e coordenação do Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha. Ressalta-se, ainda, que o manejo clínico e qualquer metodologia descrita nesta parte contaram com a aprovação do Conselho de Bioética de Minas Gerais (ETIC 025/97), além do consentimento verbal/escrito, após esclarecimento minucioso a todos os pacientes envolvidos neste estudo.

Como parte da rotina do CTR-DIP, todos os pacientes foram submetidos a uma extensa avaliação bioquímica/sorológica e clínica para confirmação e categorização da infecção. Dentre os exames sorológicos e bioquímicos solicitados encontram-se o teste de imunoenensaio enzimático (ELISA), imunofluorescência indireta (RIF) e hemaglutinação indireta (HAI), utilizados para confirmação da infecção pelo *T. cruzi*. Ainda, dentro dos exames bioquímicos incluem-se as dosagens de glicose, hormônios tireoidianos, K^+ , Na^+ e uréia. A relevância destes exames bioquímicos envolve uma precisa avaliação do quadro clínico da doença de Chagas, bem como a possível eliminação de outras possíveis formas de cardiopatia.

3.3 Avaliação Clínica

No ambulatório Orestes Diniz, UFMG, foi realizado um exame clínico completo, conforme rotina, para todos os pacientes deste trabalho. Posteriormente, exames complementares foram solicitados, incluindo o raio-X de tórax, a eletrocardiografia, esofagograma ou enema opaco (sendo o último solicitado para os casos suspeitos de forma digestiva). Além disso, para todos os pacientes solicitava-se ecodoplercardiografia, teste ergométrico, eletrocardiografia dinâmica (Holter) e teste de função autonômica. Todas as avaliações clínicas solicitadas foram realizadas nas dependências do Hospital Universitário.

Tendo como base os critérios pré-estabelecidos pela *New York Heart Association* (NYHA) e os resultados dos exames associados à singularidade dos sintomas pertinentes a doença de Chagas, estabeleceu-se uma classificação criteriosa dos pacientes com cardiopatia chagásica crônica (Rocha et al. 2002; Rocha et al., 2007):

(i) FCI: pacientes assintomáticos com sorologia positiva para o *T. cruzi*, ECG e radiografias de tórax e tubo digestivo normais. Exames mais sensíveis (ECG, Holter, teste de esforço) normais.

(ii) CCC I: pacientes assintomáticos, sem alterações significativas ao exame físico, ECG, raio-X de tórax, esofagograma ou enema opaco. Presença de alterações mínimas são observadas utilizando-se exames sensíveis como o ecocardiograma ou teste de esforço.

(v) CCC IV: pacientes sintomáticos com silhueta cardíaca normal ou limítrofe. ECG com alterações avançadas (bloqueio completo do ramo direito + hemibloqueio anterior esquerdo, bloqueio átrio-ventricular grau II ou total). Ao Holter 24 horas, extra-sístoles ventriculares frequentes e complexas ou um número de pausas elevado (sugestivo de implantação de marca-passo).

(vi) CCC V: pacientes com todas (ou parciais) manifestações anteriormente descritas, porém apresentando aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole ($V_{ed} > 55$ mm) e uma silhueta cardíaca aumentada (índice cárdio-torácico – ICT – acima de 0.5 mm).

De acordo com a classificação acima, os indivíduos participantes deste projeto foram, posteriormente, agrupados em formas polares da cardiopatia chagásica crônica, sendo: (i) portadores da forma branda de cardiopatia chagásica crônica (CCC), compreendendo-se as classificações de FCI e CCC I e (ii) portadores da forma grave da CCC, compreendendo-se as classificações de CCC IV e CCC V.

3.4 População de estudo

Foi selecionado um total de 32 pacientes sendo 15 classificados com a forma cardíaca branda (09 com a forma crônica indeterminada e 06 com CCC I) e 17 classificados com a forma cardíaca severa (06 com CCC IV e 11 com CCC V).

Um grupo com 15 indivíduos não reativos foi selecionado para pareamento com o grupo de estudo de acordo com a idade e sexo. Este grupo foi classificado como “grupo controle”.

Amostras de soro de pacientes, previamente estocadas em freezer -80°C , foram descongeladas à temperatura ambiente para realização dos ensaios imunoenzimáticos para a dosagem do TNF-alfa, TRAIL e Fas ligante.

3.5 Ensaios Imunoenzimáticos

Os testes foram realizados em microplacas previamente sensibilizadas com anticorpo primário ou de captura contra os respectivos marcadores testados (TNF- α , TRAIL e Fas Ligante) na qual foram distribuídas quantidades variadas de diluente em cada poço, para cada um dos testes, de acordo com recomendações dos fabricantes. Em seguida, foram adicionadas amostras de padrão em diluições seriadas, amostras e controles negativos por poço e coberta com fita adesiva e incubada por 2 horas a temperatura ambiente. A seguir as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem. Posteriormente foram adicionados os conjugados marcados com peroxidase e incubadas a temperatura ambiente, por tempos sugeridos pelo fabricante. A seguir as microplacas foram novamente lavadas por quatro vezes.

Posteriormente às microplacas foram adicionadas soluções de substrato e novamente incubadas protegidas da luz e à temperatura ambiente. As reações foram interrompidas com a adição de solução de parada (ácido sulfúrico 2N) a cada poço.

A leitura da reação foi feita em leitor de ELISA (SOFT-MAX[®] PRO 4.0- Life Sciences edition) a 450 nm.

3.5.1 Dosagem plasmática de TNF- α

Para a realização da dosagem de TNF- α , a reação foi realizada com o KIT Human TNF- α /TNFSF1A Immunoassay (fabricante Quantikine®), baseado no ELISA sanduíche e recomendações sugeridas pelo fabricante.

Para este ensaio o padrão utilizado foi preparado em diluições seriadas de 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL e 15,6 pg/mL.

3.5.2 Dosagem plasmática de TRAIL

Para a realização da dosagem de TRAIL, a reação foi realizada com o KIT Immunoassay Human Trail (fabricante Biosource) cuja reação se baseia no método de ELISA sanduíche e todos os reagentes foram preparados segundo metodologia sugerida pelo fabricante. As amostras de soro foram diluídas 1:2 com tampão diluente padrão.

Para este ensaio o padrão utilizado foi preparado em diluições seriadas de 3000 pg/mL, 1.500 pg/mL, 750 pg/mL, 375 pg/mL, 187,5 pg/mL, 93,7 pg/mL e 46,8 pg/mL, 0 pg/mL, conforme recomendação do fabricante.

3.5.3 Dosagem plasmática de Fas ligante

Para a realização da dosagem de Fas Ligante, a reação foi realizada com o KIT Human Fas Ligand/TNFSF6 Immunoassay (fabricante Quantikine®) cuja reação se baseia no método de ELISA sanduíche e todos os reagentes foram preparados segundo metodologia sugerida pelo fabricante.

Para este ensaio o padrão utilizado foi preparado em diluições seriadas de 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL e 15,6 pg/mL, conforme recomendação do fabricante.

3.6 Análise Estatística

Os parâmetros avaliados, em cada grupo de paciente, foram representados pela média de seus valores e respectivo erro médio padrão ou então, pelos valores absolutos

com respectiva média (gráficos de dispersão). Utilizou-se ANOVA para múltiplas comparações; porém, quando ANOVA indicou significância, utilizou-se o teste Tukey-Kramer HSD e Bonferroni para nova avaliação entre os grupos. Para as avaliações de correlações clínicas e os achados bioquímicos, utilizou-se a regressão linear. Todas as análises foram feitas através dos programas *INSTAT* e *GraphPad Prism*.



4. RESULTADOS

4.1 População estudada

O presente estudo envolveu a participação de 32 indivíduos portadores de doença de Chagas crônica e 15 indivíduos não infectados pelo *T. cruzi*. Os portadores da doença de Chagas foram, por sua vez, agrupados clinicamente, em forma clínica cardíaca BRANDA e GRAVE com 15 e 17 indivíduos em cada forma, respectivamente. A *tabela I* apresenta a distribuição quantitativa destes pacientes, bem como sua distribuição por sexo, idade e por funcionalidade cardíaca, de acordo com a classificação da *New York Heart Association* (NYHA).

Dos indivíduos apresentando cardiopatia chagásica branda, 09 foram diagnosticados com a forma crônica indeterminada (FCI) e 06 com cardiopatia chagásica crônica grau I (CCCI). Por outro lado, daqueles indivíduos apresentando uma cardiopatia chagásica grave, 06 foram classificados com CCC4 e 11 com CCC5, segundo Rocha et al. 2007.

Tabela I. Distribuição do grupo de estudo.

GRUPO DE ESTUDO	IDADE	SEXO	CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA *	NYHA**
Não infectados	36.75 ± 10.27	♂ = 68.75% ♀ = 31.25%	_____	I: 100%
CCC BRANDA	48.15 ± 8.74	♂ = 45% ♀ = 55%	FCI: 55% CCC I: 45%	I: 100%
CCC GRAVE	39.90 ± 9.15	♂ = 55% ♀ = 45%	CCC IV: 45% CCC V: 55%	I: 45% II: 40% III: 10% IV: 5%

Os dados nesta tabela foram apresentados utilizando-se a média dos valores ou percentagem dos mesmos.

* Classificação segundo Rocha et al. 2007.

** Classificação funcional da *New York Heart Association*

4.2 Análise de correlação entre formas clínicas e disfunções cardíacas

A análise das formas clínicas em todos os indivíduos avaliados foi realizada utilizando parâmetros fisiológicos e funcionais obtidos através da eletrocardiografia dinâmica (Holter 24h), do teste de esforço, do teste de função autonômica e do ecocardiograma e, posteriormente, comparados ao grupo controle - indivíduos não infectados pelo *T. cruzi*.

4.2.1 Fração de Ejeção ventricular esquerda

A análise da porcentagem da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE) em portadores de cardiopatia chagásica grave (CCC4/CCC5) apresentou-se reduzida em relação à forma branda da doença e em relação aos indivíduos não infectados pelo *T. cruzi* (Figura 1). Esse importante parâmetro funcional cardíaco apresentou-se, estatisticamente similar entre os indivíduos não infectados e aqueles manifestando a forma branda da CCC.

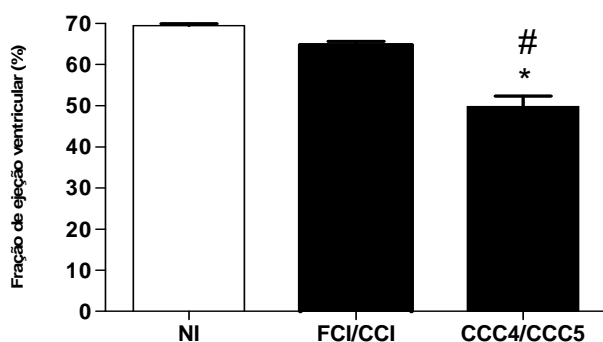


Figura 1 – Fração de ejeção ventricular esquerda em pacientes portadores da cardiopatia chagásica crônica. A fração ventricular esquerda foi apresentada como uma média da porcentagem (%) em cada grupo estudado e comparada entre as formas polares da cardiopatia chagásica crônica “branda” (FCI/CCI) ou “grave” (CCC4/CCC5) ou com o grupo controle não infectado pelo *T. cruzi* (NI). # $p < 0.01$ em relação ao grupo NI e * $p < 0.01$ em relação à forma branda.

4.2.2 Diâmetro diastólico ventricular esquerdo

A análise do diâmetro diastólico ventricular esquerdo (VeD), juntamente com a FE constitui um primoroso parâmetro de disfunção ventricular esquerda na doença de Chagas humana. Assim, demonstrou-se que indivíduos portadores das formas CCC4/CCC5 (grave) apresentaram diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (mm) significativamente maior que aqueles indivíduos pertencentes tanto ao grupo FCI/CCCI quanto ao dos não infectados (Figura 2). De forma similar ao encontrado para a fração ventricular esquerda, o VeD dos indivíduos não infectados e apresentando forma branda da doença de Chagas apresentaram-se estatisticamente semelhantes.

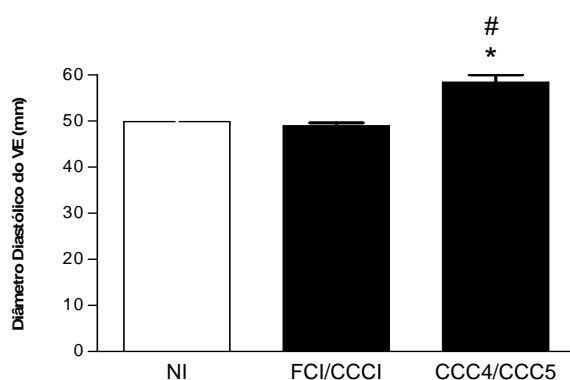


Figura 2 - Diâmetro diastólico ventricular esquerdo em indivíduos portadores da cardiopatia chagásica crônica. O diâmetro diastólico ventricular esquerdo (VeD) foi apresentado como média dos valores individuais em milímetros (mm) e os resultados comparados entre as formas polares da cardiopatia chagásica crônica “branda” (FCI/CCCI) ou “grave” (CCC4/CCC5). Todos os dados foram, ainda, avaliados comparativamente ao grupo de indivíduos não infectados (NI). # $p < 0.01$ em relação ao grupo controle (NI) e * $p < 0.01$ em relação à forma branda (FCI/CCCI).

4.2.3 Extra-sístoles ventriculares

Através da eletrocardiografia dinâmica (Holter), foi avaliada a distribuição de extra-sístoles ventriculares em um intervalo de 24 horas, o equivalente à um dia de atividades rotineiras na vida de cada indivíduo chagásico ou não. Foi demonstrado que portadores das formas clínicas CCC4/CCC5 apresentaram extra-sístoles ventriculares em 24 horas significativamente maiores do que aqueles indivíduos pertencentes tanto ao grupo FCI/CCCI quanto ao grupo dos indivíduos não infectados (Figura 3). Este parâmetro eletrocardiográfico mostrou-se similar entre os indivíduos não infectados e aqueles apresentando forma branda da doença.

Foi avaliado, em concomitância, o número de extra-sístoles supra-ventriculares (ESSV) nestes mesmos indivíduos em 24 horas de monitoramento. Tanto os indivíduos não infectados (média: 0,33/ SEM: 0,159) quanto os indivíduos de forma branda (média: 1,81/ SEM: 1,022) ou de forma grave (média: 161,0 / SEM: 131,2) apresentaram valores esporádicos de ESSV, porém sem diferenças significativas entre eles.

Um ausência de relação estatística foi observada, também, para o número de pausas em 24 horas de monitoramento cardíaco nesses indivíduos, onde apenas os portadores da forma grave da doença apresentaram uma média de 16 pausas/24h com SEM de 14.6.

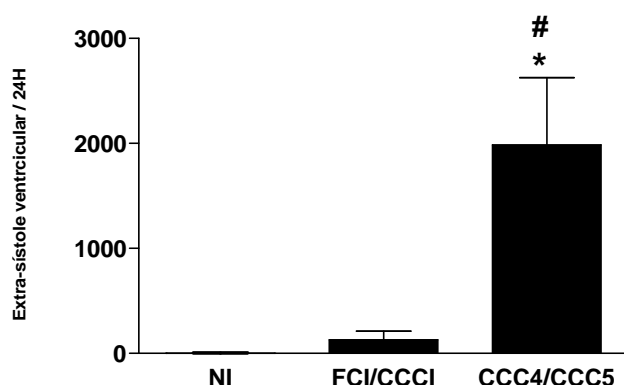


Figura 3 – Extra-sístole ventricular em indivíduos portadores da cardiopatia chagásica crônica. O parâmetro da extra-sístolia ventricular foi apresentado como uma média dos valores individuais em um prazo de 24 horas e, estes resultados, comparados

entre as formas polares da cardiopatia chagásica crônica “branda” (FCI/CCCI) ou “grave”(CCC4/CCC5). # $p < 0.01$ em relação ao grupo não infectado (NI) e * $p < 0.01$ em relação à forma branda (FCI/CCCI).

4.2.4 Frequência Cardíaca Máxima

A frequência cardíaca máxima (Fcm) foi outro parâmetro escolhido para identificação do perfil clínico dos indivíduos inseridos ao nosso grupo de estudo. Aqueles indivíduos pertencentes às formas clínicas CCC4/CCC5 apresentaram a Fcm significativamente menor que os indivíduos pertencentes tanto ao grupo FCI/CCCI quanto ao grupo dos indivíduos não infectados (Figura 4). Não houve diferença significativa entre os indivíduos da forma branda e os não infectados.

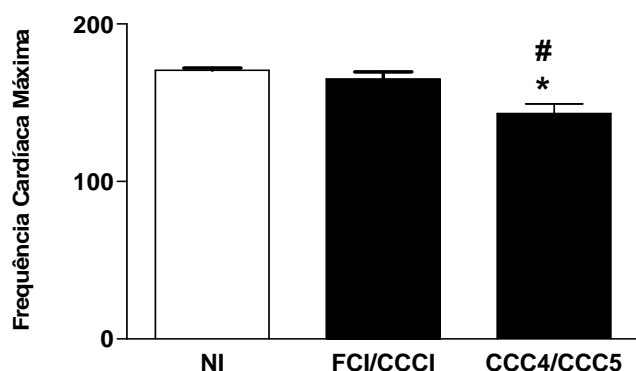


Figura 4 - Frequência cardíaca máxima em indivíduos chagásicos apresentando a cardiopatia chagásica crônica. A frequência cardíaca máxima (FCm) foi apresentada como a média dos valores individuais e os resultados comparados entre as formas polares da cardiopatia chagásica crônica “branda” ou “grave”. # $p < 0.01$ em relação ao grupo não infectado (NI) e * $p < 0.01$ em relação à forma branda (FCI/CCCI).

4.3 Avaliação do TNF-alfa plasmático e suas correlações com as funções ventriculares esquerdas

Após indentificado alguns parâmetros de funcionalidade cardíaca nos pacientes chagásicos avaliados neste estudo, procedeu-se a quantificação da citocina plasmática pró-inflamatória com conhecida função na via geradora da apoptose: o TNF-alfa.

Foi observado que indivíduos com a forma grave da doença apresentaram níveis mais elevados de TNF-alfa solúvel no plasma quando comparados com o grupo controle ou mesmo com aqueles apresentando a forma branda da doença (Figura 7A).

A seguir, optou-se por verificar se esses níveis elevados de TNF-alfa apresentariam correlação clínica com os parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo. Foi observada uma boa correlação inversa entre os níveis da citocina e a fração de ejeção ventricular esquerda (Figura 7B), além de uma boa correção direta entre os níveis de TNF-alfa e o diâmetro ventricular esquerdo (Figura 7C).

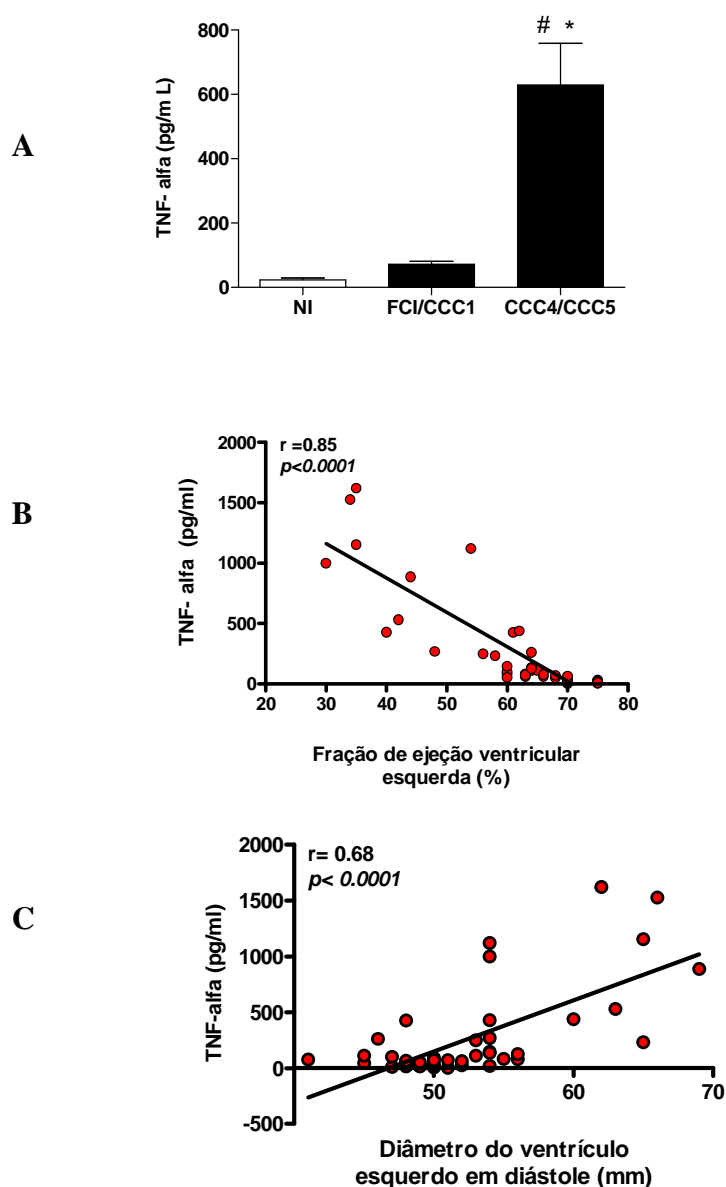


Figura 5 - Correlação entre o TNF-alfa plasmático e os parâmetros funcionais cardíacos na doença de Chagas. Os níveis plasmáticos de TNF-alfa foram avaliados nas diferentes formas clínicas polares da doença de Chagas (A) e esses valores correlacionados aos parâmetros funcionais cardíacos de fração de ejeção ventricular (B) e diâmetro do ventrículo esquerdo em diástole (C). # $p < 0.01$ em relação ao grupo não infectado (NI) e * $p < 0.01$ em relação à forma branda (FCI/CCCI).

Por outro lado, algumas variáveis cardíacas não apresentaram correlações positivas ou negativas com os níveis de TNF-alfa plasmáticos. Estas variáveis como: extra-sístoles supra-ventriculares/24 horas, frequência cardíaca máxima, consumo máximo de oxigênio e déficit cronotrópico encontram-se descritas na Tabela II.

Tabela II – Ausência de correlação entre o TNF-alfa e parâmetros cardíacos

	R	p
TNF-alfa x ESV 24h	0.574	< 0.001
TNF-alfa x ESSV 24h	0.27	= 0.067
TNF-alfa x Fcmax	0.247	= 0.097
TNF-alfa x VO ₂ max	0.17	= 0.256
TNF-alfa x Déficit cronotrópico	0.431	= 0.0027

4.4 Análise das variáveis de funcionalidade cardíaca associadas ao TRAIL solúvel

Após definido o perfil clínico e funcional dos indivíduos chagásicos avaliados neste estudo, procedeu-se a quantificação de outra citocina plasmática também com conhecida função na via geradora da apoptose: o TRAIL.

Foi observado que indivíduos com a forma grave da doença apresentaram níveis mais elevados de TRAIL solúvel no plasma quando comparados com o grupo controle ou mesmo com aqueles apresentando a forma branda da CCC (Figura 8A).

A seguir, verificou-se se esses níveis elevados de TRAIL apresentariam também alguma correlação clínica com os parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo, como avaliado anteriormente para o TNF-alfa. Observou-se uma boa correlação inversa entre os níveis da citocina e a fração de ejeção ventricular esquerda (Figura 8B), além de uma boa correção direta entre os níveis de TRAIL e o diâmetro ventricular esquerdo (Figura 8C).

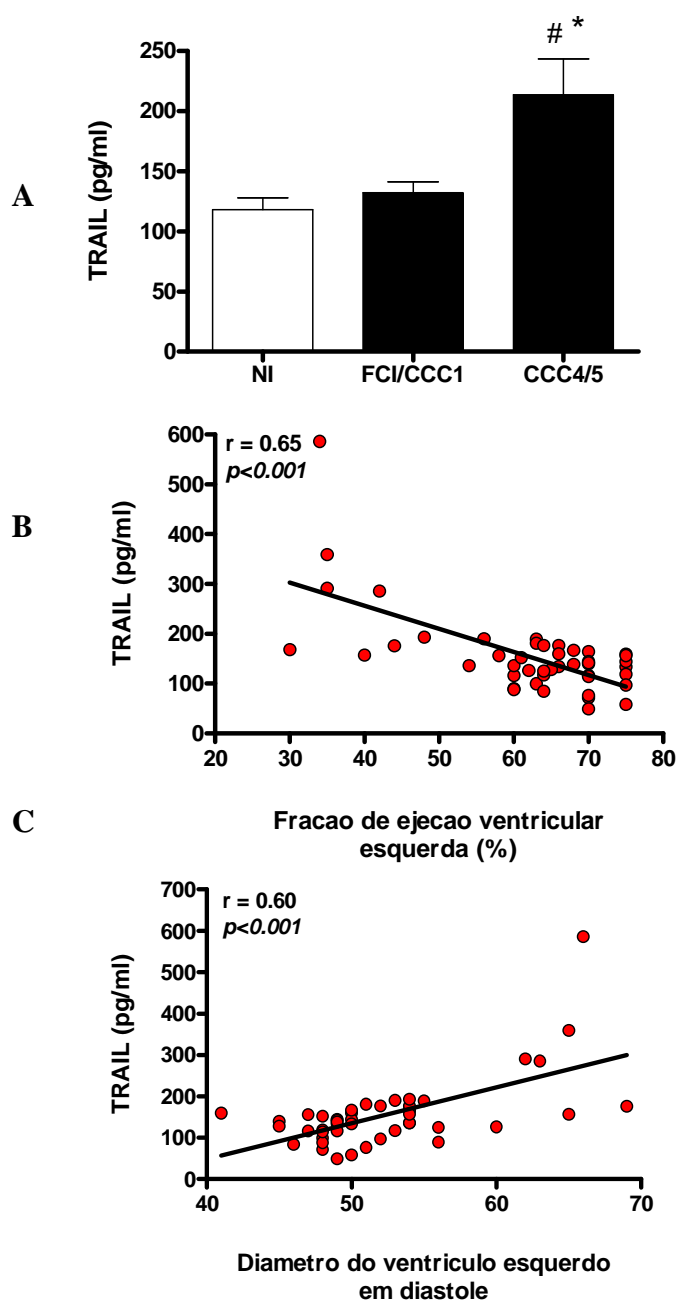


Figura 6- Correlação entre o TRAIL solúvel e parâmetros funcionais da cardiopatia chagásica crônica. Os níveis plasmáticos de TRAIL foram avaliados e os resultados correlacionados com os parâmetros funcionais das formas polares da CCC.

[#] $p < 0.01$ em relação ao grupo não infectado (NI) e ^{*} $p < 0.01$ em relação à forma branda (FCI/CCCI).

Por outro lado, algumas variáveis cardíacas não apresentaram correlações positivas ou negativas com os níveis de TRAIL plasmáticos. Estas variáveis como: extra-sístoles supra-ventriculares/24 horas, frequência cardíaca máxima, consumo máximo de oxigênio e déficit cronotrópico encontram-se descritas na Tabela III.

Tabela III - Variáveis sem correlação entre o TRAIL e algumas funções cardíacas

	<i>r</i>	<i>p</i>
ESV/24h	0.35	0.017
ESSV/24 h	0.18	0.2108
FREQUÊNCIA CARDÍACA MÁXIMA	0.25	0.089
VOLUME DE OXIGÊNIO MÁXIMO	0.11	0.4605
DÉFICIT CRONOTRÓPICO	0.26	0.082

4.5 Análise das variáveis de funções cardíacas para o FasLigante na doença de Chagas

As avaliações utilizando a terceira citocina plasmática com conhecida função na via geradora da apoptose: o Fasligante, demonstraram que indivíduos com as formas branda e grave da doença apresentaram níveis mais elevados de Fasligante solúvel no plasma quando comparados com o grupo controle, não havendo portanto diferença significativa entre a forma grave com aqueles apresentando a forma branda da doença (Figura 9A).

Ao verificar se esses níveis elevados de Fasligante nas formas polares da doença de Chagas apresentariam correlação clínica com os parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo, observou-se uma tendência à correlação inversa entre os níveis da citocina e a fração de ejeção ventricular esquerda (Figura 9B), assim como uma tendência à correlação direta entre os níveis de Fasligante e o diâmetro ventricular esquerdo (Figura 9C).

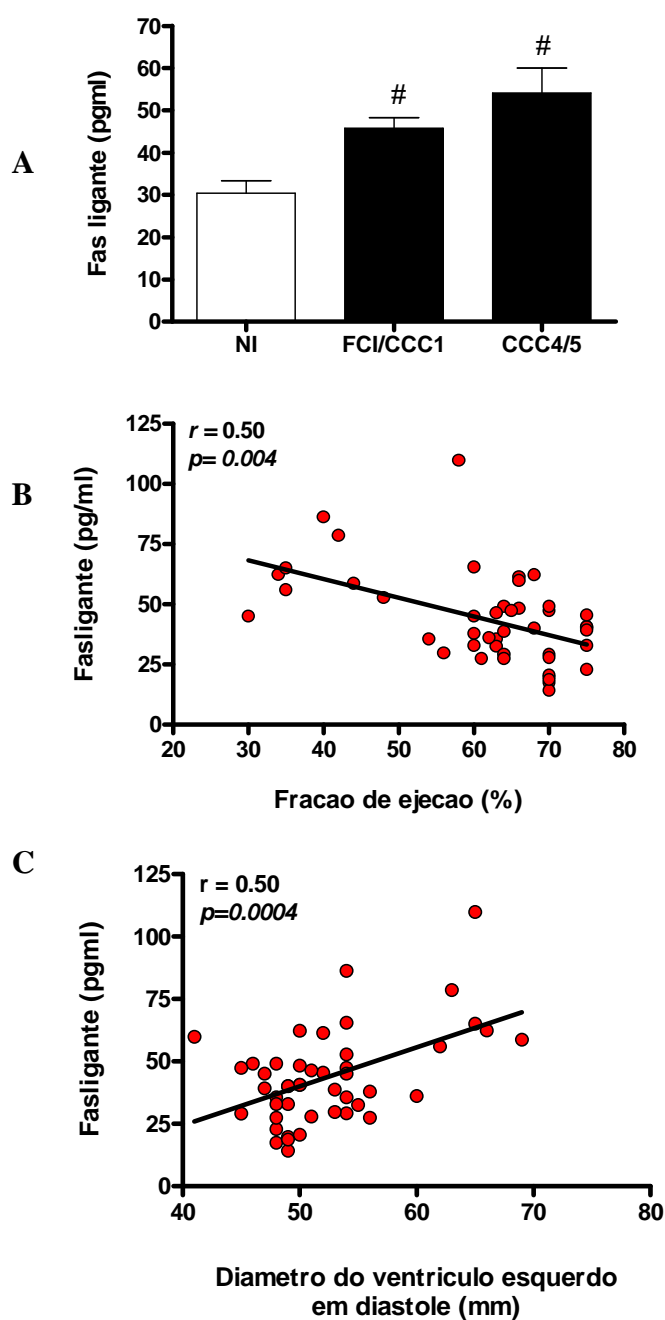


Figura 7- Correlação entre o Fasligante plasmático e os parâmetros funcionais cardíacos na doença de Chagas. Os níveis plasmáticos de Fasligante foram avaliados e os resultados correlacionados com os parâmetros funcionais cardíacos das formas polares da doença (branda e grave) [#] $p < 0.01$ em relação ao grupo não infectado (NI) e * $p < 0.01$ em relação à forma branda (FCI/CCC1).

As demais variáveis cardíacas analisadas não apresentaram correlação positiva ou negativa com os níveis de Fasligante plasmáticos. Estas variáveis como: extra-sístoles supra-ventriculares/24 horas, frequência cardíaca máxima, consumo máximo de oxigênio e déficit cronotrópico foram apresentadas na Tabela IV.

Tabela IV - Variáveis sem correlação entre o Fas ligante e algumas funções cardíacas.

	<i>r</i>	<i>p</i>
FASligante x ESV 24h	0.18	0.2186
FASligante x ESSV 24h	0.10	0.5064
FASligante x Fcmax	0.36	0.013
FASligante x VO2max	0.32	0.0297
FASligante x Déficit cronotrópico	0.27	0.070

5. DISCUSSÃO

O remodelamento cardíaco na doença de Chagas humana é um importante fator de definição para o desenvolvimento e progressão da cardiopatia chagásica crônica (CCC). O pilar para o início desse processo de remodelamento cardíaco baseia-se no paradigma existente entre “parasito e hospedeiro”. A simples presença do *T. cruzi* ou de suas moléculas antigênicas na circulação e/ou nas células miocárdicas é capaz de desencadear uma cascata de eventos inflamatórios coordenada, principalmente, por mediadores inflamatórios (Machado et al. 2000, Bilate & Cunha-Neto 2008). Esses mediadores inflamatórios potencializam alterações moleculares nas células miocárdicas conduzindo-as às alterações morfo-funcionais como hipertrofia, necrose, fibrose intersticial, proliferação de fibroblastos, degeneração de colágeno e, recentemente, eventos de morte celular programada denominada “apoptose”. Esses eventos, em conjunto, constituem fatores de remodelamento cardíaco que, a médio ou longo prazo, contribuiriam para a perda da funcionalidade do miocárdio (Punukollu et al. 2007, Cohn et al. 2000).

Nesse sentido, alguns estudos têm sugerido que os eventos apoptóticos, induzidos por mediadores inflamatórios (citocinas, moléculas reativas de oxigênio, ou peptídeos inflamatórios), estariam associados à morte de cardiomiócitos e de células do parênquima cardíaco durante a infecção chagásica aguda ou crônica em humanos (Tostes et al. 2005) ou em modelos experimentais (Zang et al. 1999, deSouza et al. 2003). Dentre os mediadores mais importantes nesse processo de morte celular programada, encontram-se os membros da superfamília do TNF: TNF-alfa (*Tumor Necrosis Factor – alpha*), o TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) e o FasLigante/CD95L, todos apresentando alta afinidade por receptores de superfície celular iniciadores da cascata intracelular da apoptose (Fas et al. 2006). Conhecida a afinidade desses membros da superfamília do TNF pelos receptores de morte celular e, em decorrência da ausência de informações científicas sobre sua aplicabilidade na clínica da cardiopatia chagásica, nesse estudo avaliou-se a concentração plasmática desse ligantes denominados “biomarcadores de apoptose” e os eventos de disfunção ventricular esquerda característicos da CCC.

Níveis elevados de TNF-alfa foram encontrados tanto em pacientes chagásicos apresentando a forma indeterminada (assintomática) da doença quanto naqueles

apresentando alterações graves de função ventricular ou de condução elétrica. O TNF-alfa é descrito como uma importante citocina pró-inflamatória sintetizada por macrófagos previamente primados pelo IFN-gama, pelo próprio TNF-alfa (ação autócrina) ou outros estímulos capazes de ativar os receptores do tipo Toll (TLR) nessas células inflamatórias (Ropert et al. 2002, Tarleton 2007). Essa ação efetora sobre os macrófagos propicia a polarização de algumas citocinas ou mediadores inflamatórios (ex. óxido nítrico, LTB4, PAF) cujos mecanismos de ação contribuem indiretamente para a eliminação dos tripanosomatídeos (Costa et al. 2000, Silva et al. 2003, Talvani et al. 2002, Stafford e tal. 2002). No modelo humano, nosso grupo demonstrou, previamente, uma importante correlação entre o TNF-alfa circulante e os parâmetros graves de disfunção ventricular esquerda na doença de Chagas (Talvani et al. 2004). Alguns autores, inclusive, têm apresentado o TNF-alfa como um agente preditor independente de mortalidade em doenças cardíacas de outras etiologias (Dunlay et al. 2008).

As disfunções progressivas de ventrículo esquerdo ocorrem frequentemente na cardiopatia chagásica, conduzindo a uma piora do quadro clínico do paciente. Os mecanismos ou eventos que conduzem tais processos fisiopatológicos não se encontram totalmente esclarecidos, apesar de se acreditar que a resposta inflamatória seja a maior responsável pelo processo auto-destrutivo observado na CCC (Billate & Cunha-Neto 2008). No entanto, acredita-se também no princípio do “ciclo vicioso” miocárdico, o que em outras palavras significa que após a agressão desencadeada pelo sistema imune na tentativa de destruir o parasito, o miocárdio sofreria um mecanismo compensatório para manter sua homeostase. Entende-se por mecanismo compensatório uma hipertrofia ventricular esquerda, uma dilatação da câmara ventricular esquerda, um aumento e uma sustentabilidade da resposta simpaticomimética, bem como a atuação de vias reguladoras intrínsecas como o sistema Renina-Angiotensina Aldosterona (SRAA) (Patterson & Adams 1996). Assim, quanto mais resposta inflamatória, maior o processo de compensação e maior o mecanismo de remodelamento cardíaco.

Nossos achados nesse presente estudo reforçam a idéia do TNF-alfa como um promissor marcador de insuficiência ventricular esquerda na CCC apresentando-se altamente correlacionado com dois importantes parâmetros funcionais do ventrículo

esquerdo: a fração de ejeção ventricular esquerda (FEV) e o diâmetro ventricular esquerdo em diástole (DVED). Em especial, nesse estudo, uma atenção especial foi destinada a essa citocina por sua potencial capacidade em induzir eventos apoptóticos através da alta afinidade de ligação aos receptores de morte celular.

De forma similar ao TNF-alfa circulante, o TRAIL (denominado de Apo2ligante) também demonstrou expressiva correlação clínica com os distúrbios de função ventricular observados na CCC. O TRAIL é descrito como um dos mais efetivos membros da superfamília do TNF capaz de induzir a morte celular programada (Chaudhari et al. 2006), além de apresentar alta homologia com os dois outros membros dessa superfamília: o TNF-alfa e o FasLigante/CD95L (Wiley et al. 1995). Nossos achados demonstraram que, de forma similar ao TNF-alfa, o TRAIL também apresentou uma boa correlação clínica com a redução da FEV e com o aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DVED).

Nesse presente estudo, apesar de nosso grupo ter encontrado correlações consistentes entre a disfunção ventricular esquerda e os ligantes (TNF-alfa, TRAIL e FasLigante/CD95L), uma questão ainda permanece não respondida: até que ponto a apoptose contribui, verdadeiramente, para os eventos de insuficiência cardíaca na doença de Chagas? A hipótese para essa relação de “causa-efeito” (apoptose-lesão) se baseia puramente nos trabalhos de histopatologia onde, pacientes autopsiados com as formas graves da CCC, apresentavam maiores perdas de unidades de cardiomiócitos (Tostes 2005). Posteriormente, observou-se também que o *T. cruzi* tanto era capaz de induzir apoptose em células imunes circulantes do hospedeiro quanto era capaz de prevenir o mesmo evento de morte celular nos cardiomiócitos através de suas moléculas de superfície denominadas cruzipaína (Nakajima-Shimada et al. 2000, Aoki et al. 2006). Esses eventos contraditórios podem ser compreendidos à luz dos conceitos evolutivos de sobrevivência do organismo parasita e sua inter-relação com as células de seu hospedeiro vertebrado.

Independente dessa “hipótese” de proteção para o cardiomiócito durante a infecção pelo *T. cruzi*, é indiscutível que a síntese de mediadores inflamatórios, também estimulados pela presença do parasito, inicie uma seqüência independente de eventos apoptóticos ao longo de anos de infecção. Nosso grupo descreveu anteriormente que a

resposta inflamatória em modelos experimentais (Talvani et al. 2000) ou em seres humanos (Talvani et al. 2004) na doença de Chagas era parcialmente dependente de interferon-gama (IFN-gama) e de outras citocinas pró-inflamatórias. E uma idéia que sustentaria a participação da apoptose nos eventos associados à cardiopatia chagásica, seria exatamente o fato do IFN-gama potencializar a produção de alguns marcadores solúveis de apoptose (ex. TRAIL, TNF-alfa), via ativação de STAT 1 (Miura et al. 2006).

Finalmente, o terceiro membro da superfamília do TNF avaliado em nosso trabalho foi o FasLigante/CD95L. É descrito que os receptores tanto de FasLigante/CD95L quanto de TNF-alfa são encontrados em cardiomiócitos submetidos ao estresse oxidativo ou submetidos a condições fisiológicas de hipóxia. O FasLigante/CD95L circulante é considerado também um potente indutor de apoptose, além de ser descrito por sua capacidade de ativação celular, de regulação da atividade quimiotática e efetora e por estar associado à síntese de citocinas e quimiocinas na doença de Chagas (de Oliveira et al. 2007, Guillermo et al. 2007). Inúmeros estudos têm examinado o papel de FasLigante/CD95L ou de seu receptor nos eventos apoptóticos no tecido cardíaco. Em biópsias proveniente de pacientes com disfunção cardíaca, a expressão de Fas foi parcialmente restrita a áreas de fibrose e mostrou-se, contraditoriamente, independente às áreas em apoptose (Filippatos et al. 1999).

De fato, nossos resultados não distinguiram concentrações diferentes de FasLigante/CD95L entre os pacientes chagásicos apresentando alterações eletrofuncionais graves ou brandas. Em nosso estudo, apenas TNF-alfa e TRAIL apresentaram altas concentrações naqueles pacientes com maiores seqüelas funcionais ou com distúrbios no sistema de condução cardíaco. No entanto, essa ausência na diferenciação do FasLigante/CD95L entre os grupos polares da doença de Chagas não necessariamente reduz a importância desse peptídeo como um marcador inflamatório para eventos de apoptose na cardiopatia chagásica. Em outras palavras, nossos resultados mostraram que indivíduos não chagásicos (grupo controle) e pacientes com a forma branda da doença (forma assintomática ou grau I da CCC “alterações mínimas ao eletro- e ecocardiograma”) apresentaram concentrações plasmáticas semelhantes de TNF-alfa e TRAIL, havendo aumento significativo desses marcadores apenas nos

indivíduos com CCC grave. Ao contrário, o FasLigante/CD95L foi detectável já em indivíduos com CCC branda (em níveis semelhantes aos indivíduos com CCC grave) e, dessa forma, acreditamos que esse marcador de eventos apoptóticos apresente maior sensibilidade na detecção dos eventos patológicos cardíacos associados à infecção pelo *T. cruzi*. Justificando ainda os achados descritos por Filippatos e colaboradores, relacionando a presença de FasLigante/CD95L não à apoptose, mas sim à fibrose cardíaca, torna-se importante lembrar que mesmo naqueles indivíduos considerados “assintomáticos” (eletrocardiografia, ecocardiografia ou mesmo ressonância magnética nuclear normais), lesões no interstício cardíaco podem ser encontrados em análises histopatológicas (Barreto et al. 1995).

Em suma, a presença do parasito, a resposta inflamatória cardíaca e os eventos patológicos associados (ex. apoptose e fibrose) podem contribuir substancialmente para o desenvolvimento e a progressão das lesões e do consequente remodelamento cardíaco na fase crônica da doença de Chagas humana. Os achados de correlação descritos nesse trabalho envolvendo ligantes solúveis da superfamília do TNF e distúrbios funcionais ventriculares na doença de Chagas são inéditos na literatura científica. E o estabelecimento da hipótese dos eventos apoptóticos conduzindo distúrbios funcionais na CCC (ex. baixa fração de ejeção ventricular, aumento do diâmetro ventricular esquerdo, mas não parâmetros arritmogênicos) tornou-se ainda mais sustentada. Porém, é evidente que de forma isolada, nossos resultados não podem confirmar a real participação da apoptose nos distúrbios cardíacos avaliados. Novos estudos em modelos experimentais ou mesmo em seres humanos são necessários para o estabelecimento da cascata de eventos envolvendo a morte celular programada (apoptose) e os eventos clínicos da CCC. De qualquer forma, nossos resultados, em concordância com os demais trabalhos em modelo experimental ou em seres humanos, abrem promissoras perspectivas para o estudo e para a utilização desses marcadores inflamatórios no acompanhamento e no prognóstico clínico da cardiopatia chagásica humana.



6. CONCLUSÃO

Nossos resultados descreveram a existência de uma forte correlação clínica entre os ligantes solúveis da superfamília do TNF (TNF-alfa, TRAIL e FasLigante/CD95L) e os distúrbios funcionais, mas não arritmogênicos, do ventrículo esquerdo na cardiopatia chagásica crônica (CCC). Esses resultados por estarem associados a ligantes de receptores de morte celular programada reforçam a idéia de mecanismos apoptóticos direcionando os distúrbios clínicos/patológicos na doença de Chagas humana.

É possível que em estágios iniciais ou finais da CCC, a apoptose possa contribuir também para os distúrbios eletrofuncionais cardíacos, visto que altas concentrações de TNF-alfa apresentaram correlação considerável com distúrbios de ritmo, observados através do ECG dinâmico.

Finalmente, os resultados deste trabalho sugerem que a inflamação sustentada observada durante a fase crônica da doença de Chagas possa levar a uma ativação de múltiplas vias de morte celular que contribuam para a morte progressiva dos cardiomiócitos. Portanto, o grau de apoptose nos cardiomiócitos parece ser um determinante crítico na remodelagem negativo da CCC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, LC; RIZZO, LV; IANNI, B; ALBUQUERQUE, F; BACAL, F; CARRARA, D; BOCCHI, EA; TEIXEIRA, HC; MADY, C; KALIL, J; CUNHA-NETO, E (2001). Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Autoimmun.* **17**: 99-107.

ACQUANTELLA, H et al (1980). M mode and two dimensional echocardiography in Chronic Chagas heart disease. *Circulation* **62** (1): 787-799.

ALMEIDA, OD; CORTELAZZI, PS; GODOY, MF; CARVALHO, AC; SUCCI, JE; ANDRADE, JC; BUFFOLO, E; LEÃO, LE; GALLUCCI, C (1985). Direct communication between the right branch of the pulmonary artery and left atrium. Report of a case and review of the literature. *Arq Bras Cardiol* **45** (4): 271-275.

ANDRADE, ZA (1984). The canine model of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **79**: 77-83.

AOKIMDEL, P; CANO, RC; PELLEGRINI, AV; TANOS, T; GUINAZU, NL; COSO, AO; GEA, S (2006). Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. *Microbes Infect* **8**: 1723-1731.

ARQUES, S; ROUX, E; SBRAGIA, P; PIERI, B; GELISSE, R; LUCCIONI, R; AMBROSI, P (2007). Usefulness of bedside tissue doppler echocardiography and B-type natriuretic peptide (BNP) in differentiating congestive heart failure from noncardiac cause of acute dyspnea in elderly patients with a normal left ventricular ejection fraction and permanent, nonvalvular atrial fibrillation: insights from a prospective, mono center study. *Echocardiography: A J. of CV ultrasound & Allied Tech.* **24** (5): 499-507.

BAHIA-OLIVEIRA, LMG; GOMES, JAS; CANÇADO, JR; FERRARI, TC; LEMOS, EM; LUZ, ZMP; MOREIRA, MC; GAZZINELLI, G; CORREA-OLIVEIRA, R (2000). Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J. Infect. Dis.* **182**: 634-638.

BAHIA-OLIVEIRA, LMG; GOMES, JAS; ROCHA, MOC; MOREIRA, MCV; LEMOS, EM; LUZ, ZMP; PEREIRA, MES; COFFMAN, RL; DIAS, JCP; CANÇADO, JR; GAZZINELLI, G; CORREA-OLIVEIRA, R (1998). IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz. J. Med. And Biol. Res.* **31**: 127-131.

BARBOSA, AJA; GOBBI, H; LINO, BT; LAJES-SILVA, E; RAMIREZ, LE; TEIXEIRA, VPA; ALMEIDA, HO (1986). Estudo comparativo entre o método convencional e o método peroxidase antiperoxidase na pesquisa do parasitismo tissular na cardiopatia chagásica crônica. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo* **28**: 91-96.

BARRETO, AC; IANNI, BM (1995). The undetermined form of Chagas heart disease: concept and forensic implications. *São Paulo med J.* **113**: 797-801.

BARROS-MAZON, S et al (2004). Differential regulation of lymphoproliferative responses to *Trypanosoma cruzi* antigen in patients with the cardiac or indeterminate form of Chagas disease. *Clinical Immunology* **111** (1): 137-145.

BELLOTTI, G; BOCCHI, EA; HIGUCHI, ML; BARBERO-MARCIAL, M; SOSA, E; ESTEVES-FILHO, A; KALIL, R; WEISS, R; JATENE, A; PILEGGI, F (1996). *In vivo* detection of antigens in heart of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J.* **131**: 301-307.

BILATE, AM; CUNHA-NETO, E (2008). Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **50**: 67-74.

BOWEN, ID & BOWEN, SM (1990). Programmed cell death in tumors and tissues. *Chapman and Hall*: 320.

BRAS, M; QUEENAN, B; SUSIN, SA (2005). Programmed cell death via mitochondria: different models of dying. *Biochemistry* **70** (2): 231-239.

Brazilian Consensus on Chagas disease (2005). *Rev Soc Bras Med Trop.* **38** (Suppl 3):7-29.

BRENER, Z & GAZZINELLI (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **114** (2): 103-110.

BRONFEN, E; DE ASSIS, RFS; MACHADO, GB; PERILLO, MM; ROMANHA, AJ; CHIARI, E (1989). Isolation of *Trypanosoma cruzi* samples by xenodiagnosis and hemoculture from patients with chronic Chaga's disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **84** (2): 237-240.

BROWN, SB; SAVILL, J (1999). Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol* **162** (1): 480-485.

CARRASCO, HA et al (1990). Ventricular arrhythmias and left ventricular myocardial function in chronic chagasic patients. *Int. J. Cardiol.* **28**: 35-41.

CASCINO, I; FIUCCI, G; PAPOFF, G; RUBERTI, G (1995). Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* **154** (6): 2706-2713.

CHAGAS, C (1909). Nova tripanozomíase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. n. gen., n. sp. Agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, **1**: 159-218.

CHAGAS, C (1911). Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, **3(2)**: 219-275.

CHAUDHARI, BR; MURPHY, RF; AGRAWAL, DK (2006). Following the TRAIL to apoptosis. *Immunol Res* **35**: 249-262.

CHIARI, E; LANA, M; DIAS, JCP; CHIARI, CA (1989). Hemoculture for the diagnosis of the chronic phase of Chagas' disease. *Rev.Soc.Bra. Med. Trop. São Paulo*, **22**, 19-23.

COHN, JN; FERRARI, R; SHARPE, N (2000). Cardiac Remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* **35**:569-582.

CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS (2005). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Secretaria de vigilância em saúde do Ministério da Saúde. **38** (supl.III).

CONSENSO NACIONAL DE ERGOMETRIA (II) (1995). *Arquivos Brasileiros de Cradiologia* **65**: 191-211.

COSTA, VM; TORRES, KC; MENDONÇA, RZ; GRESSER, I; GOLLOB, KJ; ABRAHAMSOHN, IA (2006). Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol* **177**: 3193-3200.

COURA, JR; ANUNZIATO, N; WILLCOX, HP (1983). Chagas' disease morbidity. I- Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **78**: 363-372.

COURA, JR; JUNQUEIRA, ACV; GIORDANO, CM; FUNATSU, IRK (1994). Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **36**: 363-368.

CUNHA-NETO, E et al (1998). Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **31**(1): 133-137.

DA SILVEIRA, AB; ARANTES, RM; VAGO, AR; LEMOS, EM; ADAD, SJ; CORREA-OLIVEIRA, R; D'ÁVILA, RD (2005). Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology* **131** (5): 627-634.

DE OLIVEIRA, GM; DINIZ, RL; BATISTA, W; BATISTA, MM; BANI CORREA, C; DE ARAÚJO-JORGE, TC; HENRIQUES-PONS,A (2007). Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* **171**: 79-86.

DE SOUZA, EM; ARAÚJO-JORGE, TC; BAILLY, C; LANSIAUX, A; BATISTA, MM; OLIVEIRA, GM; SOEIRO, MN (2003). Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in vitro and in vivo models. *Cell Tissue Res.* **314** (2): 223-235.

DIAS, JCP (1992). Epidemiology of Chaga's disease. In: WENDEL, S; BRENER, Z; CAMARGO, ME; RASSI, A. *Chagas disease (American trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. São Paulo: Edt. ISBT BRAZIL – Sociedade Brasileira Hematologia Hemoterapia. **5**: 49-80.

DIAS, JCP (2000). Vigilância epidemiológica em doença de Chagas. *Cad. Saúde Pública* **16** (Supl. 2): 43-59.

DIAS, JCP (2006). Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev. Soc. Med. Trop* **39** (4): 370-375, jul-ago.

DIAS, JCP & SCHOFIELD, CJ (1999). The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Supl. I, **94**:103-121.

DOS SANTOS, PVA; ROFFÊ, E; SANTIAGO, HC et al (2001). 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- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect* **3**: 971-984.

DUNLAY, SM; WESTON, SA; REDFIELD, MM; KILLIAN, JM; ROGER, VL (2008). Tumor necrosis factor- α and mortality in heart failure: a community study. *Circulation* **118**: 625-631.

DUTRA, WO; MARTINS-FILHO, AO; CANÇADO, JR; PINTO-DIAS, JC; BRENER, Z; FREEMAN JUNIOR, GL; COLLEY, DG; GAZZINELLI, G; PARRA, JC (1994). Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int. Immunol.* **6** (4): 499-506.

DUTRA, WO; ROCHA, MOC; TEIXEIRA, MM (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology* **21**(12): 581-587.

FAS, SC; FRITZCHING, B; SURI-PAYER, E; KRAMMER, PH (2006). Death receptor signaling and its function in the immune system. *Curr Dir Autoimmun* **9**: 1-17.

FERREIRA, RC; IANNI, BM; ABEL, LC; BUCK, P; MADY, C; KALIL, J; CUNHA-NETO, E (2003). Increased plasma levels of tumor necrosis factor- α in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98** (3): 407-411.

FILIPPATOS, G; LECHE, C; SUNGA, R; TSOUKAS, A; ANTHOPOULOS, P; JOSHI, I; BIFERO, A; PICK, R; UHAL, BD (1999). Expression of FAS adjacent to fibrotic foci in the failing human heart is not associated with increased apoptosis. *Am J Physiol* **277**: H445-H451.

FRESNO, M; KOPF, M; RIVAS, L (1997). Cytokines and infectious diseases. *Immunol. Today* **18**: 56-58.

GIRONES, N; CARRASCO-MARIN, E; CUERVO, H; GUERRERO, NA; SANOJA, C; JOHN, S; FLORES-HERRÁEZ, R; FERNÁNDEZ-PRIETO, L; CHICO-CALERO, I; SALGADO, H; CARRIÓN, J; FRESNO, M (2007). Role of *Trypanosoma cruzi* autoreactive T cells in the generation of cardiac pathology. *Ann N Y Acad Sci.* **1107**: 434-444.

GOMES, JAS; BAHIA-OLIVEIRA, MO; ROCHA, MOC; MARTINS-FILHO, AO; GAZZINELLI, G & CORREA-OLIVEIRA, R (2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th-1-specific immune response. *Infection and Immunity* **71** (3): 1185-1193.

GREEN, JR (2004). Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* **9** (suppl 4): 3-13.

GRIFFITH, TS; LYNCH, DH (1998). TRAIL: a molecule receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* **10** (5): 559-563.

GUHL, F; JARAMILLO, C; YOCKTENG, R; VALLEJO, GA; CARDENAS-ARROYO, F (1997). *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. *Lancet*, **335**: 294-295.

GUILHERMO, LV; SILVA, EM; RIBEIRO-GOMES, FL; DE MEIS, J; PEREIRA, WF; YAGITA, H; DOS REIS, GA; LOPES, MF (2007). The Fas death pathway controls coordinated expansions of type 1 CD8 and type 2 CD4 T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Leukoc Biol* **81**: 941-951.

GUIMARÃES, AC (1985). Aspectos eletrocardiográficos da cardiopatia chagásica. In: CANÇADO, JR; CHUSTER, M (eds). *Cardiopatia Chagásica* 134-137.

HAUDEK, SB; TAFFET, GE; SCHNEIDER, MD; MANN, DL (2007). TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *The Journal of Clinical Investigation* **117** (9): 2692-2701.

HENRIQUES-PONS, A; OLIVEIRA, GM; PAIVA, MM; CORREA, AF; BATISTA, MM; BISAGGIO, RC; LIU, CC; COTTA-DE-ALMEIDA, V; COUTINHO, CM; PERSECHINI, PM; ARAUJO-JORGE, TC (2002). Evidence for a perforin-mediated mechanism controlling cardiac inflammation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int. J. Exp. Pathol* **83**: 67-79.

HIGUCHI, ML (1995). O parasita e a patogenia da forma crônica da doença de Chagas. *Arq. Brás. Cardiol.* **64**: 251-254.

HIGUCHI, ML; REIS, M; AIELLO, VD; BENVENUTTI, LA; GUTIERREZ, OS; BELLOTI, G; PILEGGI, F (1997). Human chronic chagasic myocarditis is *T. cruzi* antigen and CD8+ T cell dependent. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **56**: 485-489.

HOLDENRIEDER, S; STIEBER, P (2004). Therapy control in oncology by circulating nucleosomes. *Ann NY Acad Sci* **1022**: 211-216.

IBE, W; SARASTE, A; LINDEMANN, S; BRUDER, S; BUERKE, M; DARIUS, H; PULKKI, K; VOIPIO- PULKKI, L (2007). Cardiomyocyte apoptosis is related to left

ventricular dysfunction and remodelling in dilated cardiomyopathy, but is not affected by growth hormone treatment. *European J. Heart Failure* **9**: 160-167.

ITOH, N; YONEHARA, S; ISHII, A; YONEHARA, M; MIZUSHIMA, S; SAMESHIMA, M; HASE, A; SETO, Y; NAGATA, S (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**: 233-243.

YONEHARA, S; ISHII, A; YONEHARA, M (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen codownregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* **169** (5): 1747-1756.

JONES, EM; COLLEY, DG; TOSTES, S; LOPES, ER; JONES-VNENCAK, CL; MCCURLEY, TL (1993). Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med Hyg* **48**: 348-357.

KERR, JFR; WYLLIE, AH; CURRIE, AR (1972). Apoptosis: A basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British J. Canc.* **26** (4): 239-257.

LUQUETI, AO (1990). Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis. Multicentre trial. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **85**: 497.

MACHADO, FS; MARTINS, GA; ALIBERTI, JC; MESTRINER, FL; CUNHA, FQ; SILVA, JS (2000). *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* **102**: 3003-3008.

MANOEL-CAETANO, FS & SILVA, AE (2007). Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad. Saúde Pública* Rio de Janeiro **23** (10): 2263-2274.

MARIN-NETO, JA; SIMÕES, MV; MACIEL, BC (1998). Specific diseases: cardiomyopathies and pericardial diseases. Other cardiomyopathies. In: YUSSEF, S;

CAIMS, J; CAMM, J; FALLEN, E; GERSH, BJ (eds)- Evidence based cardiology. BMJ Books, *Brit Med Association* 744-761.

MARIN-NETO, JA; SIMÕES, MV & SARABANDA, AVL (2000). Forma crônica cardíaca. In: BRENER,Z; ANDRADE, ZA & BARRAL-NETO, M (eds). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2ª ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. Pp 266-296.

MARQUES, DSO; CANESIN, MF; BARUTTA JR, F; FUGANTI, CJ; BARRETTO, CP (2006). Avaliação de pacientes assintomáticos com forma crônica da doença de Chagas através da análise do eletrocardiograma dinâmico, ecocardiograma e do peptídeo natriurético tipo B. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **87** (3): 336-343.

MARIANI, SM; MATIBA, B; BAUMLER, C; KRAMMER, PH (1995). Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD 95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol* **25** (8): 2303-2307.

MARTINS, AM; FRANCO, PRS (1982). Eletrocardiografia dinâmica em chagásicos na forma indeterminada ou sem cardiopatia aparente. *Arq. Bras. Cardiol.* **39**(5): 303-307.

MASSAD, E (2007). The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol. Infect.* **4**: 1-12.

MASTERS, SA; SHERIDAN, JP; DONAHUE, CJ; PITTI, RM; GRAY, CL; GODDARD, AD; BAUER, KD; ASHKENAZI, A (1996). Apo-3, a new member of the tumor necrosis factor receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF-kappa B. *Curr Biol* **6** (12): 1669-1676.

MELO, RB; PARENTE, GBO; VICTOR, EG (2005). Determinação do peptídeo natriurético cerebral humano em portadores da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **84** (2): 137-140.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006). Guia de Vigilância Epidemiológica. *Normas e Manuais Técnicos* 282- 296.

MIURA, Y; TSUJIOKA, T; NISHIMURA, Y; SAKAGUCHI, H; MAEDA, M; HAYASHI, H; DONG, M; HYODOH, F; YATA, K; WADA, H; SUGIAHRA, T; OTSUKI, T (2006) TRAIL expression up-regulated by interferon-gamma via phosphorylation of STAT1 induces myeloma cell death. *Anticancer Res* **26**: 4115–4124.

MONCAYO, A (1999). Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94** (Suppl I): 401-404.

MONCAYO, A (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.**98** (5), p.577-591.

NAGATA, S; GOLSTEIN, P (1995). The death factor. *Science* **267**: 1449-1456.

NAKAJIMA-SHIMADA, J; ZOU, C; TAKAGI, M; UMEDA, M; NARA, T; AOKI, T (2000). Inhibition of Fas- mediated apoptosis by *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochim Biophys Acta* **1475**: 175-183.

OTSUKI, T; SAKAGUCHI, H; TOMOKUNI, A; AIKOH, T; MATSUKI, T; ISOZAKI, Y; HYODOH, F; KAWAKAMI, Y; KUSAKA, M; KITA, S; UEKI, A (2000). Detection of alternatively spliced variant messages of Fas gene and mutational screening of Fas and Fas ligand coding regions in peripheral blood mononuclear cells derived from silicosis patients. *Immunol Lett* **72** (2): 137-143.

PATTERSON, JH; ADAMS, KF JR (1996). Pathophysiology of heart failure: changing perceptions. *Pharmacotherapy* **16**:27S-36S.

PEREIRA BARRETO, AC et al (1990). Forma indeterminada da doença de Chagas. Uma doença polimórfica. *Arq. Bras. De Cardiol.* **55**: 347-353.

PEREIRA BARRETO, AC et al (1995). Relação entre arritmia ventricular e função cardíaca na doença de Chagas. *Arq. Bras. De Cardiol.* **64** (6): 533-535.

PETER, ME; KRAMMER, PH (2003). The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* **10** (1): 26-35.

PITTI, RM; MRSTERS, SA; RUPPERT, S; DONAHUE, CJ; MOORE, A; ASHKENAZI, A (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the Tumor Necrosis Factor cytokine Family. *J Biol Chem.* **271**(22):12687-12690.

PRATA, A (2001). Clinical and Epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Rev.* **1**: 92-100.

PUNUKOLLU, G; GOWDA, RM; KHAN, IA; NAVARRO, VS; VASAVADA, BC (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* **115**: 179-183.

RAMASAWMY, R; FAE, KC; CUNHA-NETO, E; MULLER, NG; CAVALCANTI, VL; FERREIRA, RC; DRIGO, AS; IANNI, B; MADY, C; GOLDBERG, AC; KALID, J (2007). Polymorphisms in the gene for lymphotoxin-alfa predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. *J. Infect. Dis.* **196** (12): 1836-1843.

RASSI, A; RASSI, AR & RASSI, GG (2000). Fase aguda. In: BRENER, Z; ANDRADE, ZA & Barral-neto, M (eds). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2^a ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. Pp 231-245.

RASSI, JR. A; MARIN-NETO, JA (2000). Cardiopatia chagásica crônica. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo* **10** (4).

RASSI, AJR; RASSI, SG; RASSI, A (2001). Sudden death in Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* **76** (1): 75-96.

REIS, MM; HIGUCHI, ML; BENVENUTI, LA; AIELLO, VD; GUTIERREZ, PS; BELLOTTI, G; PILEGGI, F (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** (2): 165-172.

RIBEIRÃO, M; PEREIRA-CHIOCCOLA, VL; RENIA, L; FRAGATA-FILHO, A; SCHENKMAN, S; RODRIGUES, MM (2000). Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. *Paras. Immunol.* **22**: 49-53.

RIBEIRO, AL; REIS, AM; BARROS, MVL; SOUSA, MR; ROCHA, ALL; PEREZ, AA; PEREIRA, JB; MACHADO, FS; ROCHA, MOC (2002). Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in Chagas' disease. *Lancet...*

RIBEIRO, AL & ROCHA, MOC (1998). Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **31**: 301-314.

ROCHA, MOC et al (1997). Métodos não invasivos de análise funcional cardíaca. In: DIAS, JCP; COURA, JR (orgs). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*. 1^a edição. Rio de Janeiro, FIOCRUZ **14**: 237-254.

ROCHA, MOC; RIBEIRO, ALP; TEIXEIRA, MM (2002). Clinical Management of chronic Chagas cardiomyopathy. Cap. Chagas Heart Disease. *Front Biosci (in press)*.

ROCHA, MOC; RIBEIRO, AL; TEIXEIRA, MM (2003). Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front. Biosci.* **8**: 44-54.

ROCHA, MO; TEIXEIRA, MM; RIBEIRO, AL (2007). Na update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev Anti Infect Ther* **4**: 727-743.

ROPERT, C; FERREIRA, LR; CAMPOS, MA; PROCÓPIO, DO; TRAVASSOS, LR; FERGUSON, MA; REIS, LF; TEIXEIRA, MM; ALMEIDA, IC; GAZZINELLI, RT (2002). Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Microbes Infect* **4**: 1015-1025.

ROSSI, MA; SOUZA, AC (1999). Is apoptosis a mechanism of cell death of cardiomyocytes in chronic chagasic myocarditis: *International J. of Cardiol.* **68**: 325-331.

RUBERTI, G; CASCINO, I; PAPOFF, G; ERAMO, A (1996). Fas splicing variants and their effect on apoptosis. *Adv Exp Med Biol* **406**: 125-134.

SCHMUNIS, GA (1999). Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin América. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94** (Suppl.I): 93-101.

SILVA, JS; MACHADO, FS; MARTINS, GA (2003). The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci.* **8**:314-325.

SOARES, MB; PONTES-DE-CARVALHO, L; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R (2001). The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc* **73** (4): 547-559.

STAFFORD, JL; NEUMANN, NF; BELOSEVIC, M (2002). Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* **28**:187-248.

SU, X; CHENG, J; LIU, VV; LIU, C; WANG, Z; YANG, P; ZHOU, T; MOUNTZ, JD (1998). Autocrine and paracrine apoptosis are mediated by differential regulation of Fas ligand activity in two distinct Jurkat T cell populations. *J Immunol* **160**(11): 5288-5293.

TAFURI, WL (1970). Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chaga's disease. Light and electron microscope studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19** (3): 405- 417.

TAFURI, WL (1987). Patogenia da doença de Chagas. *Ver. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, **29**: 194-199.

TAKAHASHI, T; TANAKA, M; BRANNAN, CI; JENKINS, NA; COPELAND, NG; SUDA, T; NAGATA, S (1994). Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**: 969-976.

TALVANI, A; MACHADO, FS; SANTANA, GC; KLEIN, A; BARCELOS, L; SILVA, JS; TEIXEIRA, MM. (2002). Leukotriene B4 induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun.* **70**: 4247-4253.

TALVANI, A; RIBEIRO, CS; ALIBERTI, JCS; MICHAILOWSKY, V; SANTOS, PV; MURTA, SM; ROMANHA, AJ; ALMEIDA, IC; FARBER, J; LANNES-VIEIRA, J; SILVA, JS; GAZZINELLI, RT (2000). Kinetic of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy – tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and infection* **2**: 851-866.

TALVANI, A; ROCHA, MO; BARCELOS, LS; GOMES, YM; RIBEIRO, AL; TEIXEIRA, MM (2004). Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor- α in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis.* **38**: 943-950.

TARLETON, RL (2001). Parasite persistence in the aetiology of Chagas' disease. *Int J Parasitol* **31**: 549-553.

TARLETON, RL (2007). Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol.* **19**: 430-434.

TEIXEIRA, MM; GAZZINELLI, RT; SILVA, JS (2002). Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* **18**: 262-266.

TEIXEIRA, PC; IWAI, LK; KURAMOTO, AC; HONORATO, R; FIORELLI, A; STOLF, N; KALIL, J; CUNHA-NETO, E (2006). Proteomic inventory of myocardial proteins from patients with chronic Chagas' cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res.* **39**(12): 1549-1562.

TORRES, RM (1998). Ecocardiografia. In: GONTIJO, ED; ROCHA, MOC (orgs). Manejo clínico em doença de Chagas. Brasília: *Fundação Nacional de saúde*: 149.

TORRES, RM (2004). Volume do átrio esquerdo como marcador de comprometimento morfofuncional do ventrículo esquerdo na cardiopatia chagásica crônica. Tese (doutorado). Área de Concentração Infectologia e Medicina Tropical. Faculdade de Medicina da UFMG: 214.

TOSTES JR, S; ROCHA-RODRIGUES, DB; PEREIRA, GA; RODRIGUES JR, V (2005). Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *International J. of Cardiol.* **99**: 233-237.

VAGO, AR; MACEDO, AM; OLIVEIRA, RP; ANDRADE, LO; CHIARI, E; GALVÃO, LMC; REIS, DD; PEREIRA, MES; SIMPSON, AJG; TOSTES, S; PENA, SDJ (1996). Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.* **149**: 2153-2159.

WHO Expert Committee (2002). Control of Chagas disease. *World Health Organization Tech Rep* **905**: 01-109.

WILEY, SR; SCHOOLEY, K; SMOLAK, PJ; DIN, WS; HUANG, CP; NICHOLL, JK; SHUTERLAND, GR; SMITH, TD; RAUCH, C; SMITH, CA; GOODWIN, RG (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **6**: 673-682.

WILEY, SR; SCHOOLEY, K; SMOLAK, PJ; DIN, WS; HUANG, CP; NICHOLL, JK; SHUTERLAND, GR; SMITH, TD; RAUCH, C; SMITH, CA; GOODWIN, RG (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **6**: 673-682.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). Control of Chagas' disease. Second Report of the WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series*. Geneva, **905**: 109.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). Tropical Disease Research: progress 2003-2004 Seventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases. Programme Report n.17, Geneva, 2005.

XAVIER, SS; SOUSA, AS; VINAS, PA; JUNQUEIRA, AC; BOIA, MN; COURA, JR (2006). Chronic chagasic cardiopathy in the Rio Negro, Amazon State. Report of three new autochthonous cases confirmed by serology, clinical examination, chest X-rays, electro and echocardiography. *Rev Soc Bras Med Trop* **39**: 211-216.

ZHANG, J; ANDRADE, ZA; YU, ZX; ANDRADE, SG; TAKEDA, K; SADIRGURSKY, M; FERRANS, VJ (1999). Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. *J Mol Cell Cardio* **31**: 581-596.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)