

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**AVALIAÇÃO DOS PAPÉIS DA
LINFOTOXINA ALFA (LT- α) E DE SEU
POLIMORFISMO GENÉTICO NO
DESENVOLVIMENTO DA FORMA
CARDÍACA DA DOENÇA DE CHAGAS
CRÔNICA**

Cristina Wide Pissetti

Uberaba, MG

Maio, 2009

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Cristina Wide Pissetti

**AVALIAÇÃO DOS PAPÉIS DA
LINFOTOXINA ALFA (LT- α) E DE SEU
POLIMORFISMO GENÉTICO NO
DESENVOLVIMENTO DA FORMA
CARDÍACA DA DOENÇA DE CHAGAS
CRÔNICA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Clínica”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior

**Uberaba, MG
Maio, 2009**

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é considerada a doença parasitária de maior impacto na América Latina. Apresenta as fases aguda e crônica. A fase crônica caracteriza-se pelas formas clínicas indeterminada, cardíaca, digestiva, mista e nervosa. A razão do desenvolvimento de uma forma ou de outra ainda não é conhecida. Especula-se que fatores genéticos do hospedeiro e do parasito podem contribuir para tal. Em relação aos fatores genéticos do hospedeiro, vários genes poderiam ser eleitos como candidatos, especialmente os de citocinas. Assim, nesse estudo, o gene da linfotóxina alfa (LT- α) foi analisado. A LT- α é uma citocina inflamatória, importante na organização e manutenção do processo inflamatório, pela disposição das células no local da inflamação e por estimular moléculas de adesão, como VCAM, ICAM e e-selectina. Além disso, localiza-se no cromossomo 6, em uma região altamente polimórfica do genoma humano. Embora pouco estudada em doença de Chagas, estudos experimentais mostraram sua ação direta sobre tripomastigotas e a correlação de haplótipos (LTA+80C/+252G) com a suscetibilidade ao desenvolvimento da forma cardíaca da doença. Esse estudo se propôs a identificar a frequência do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252, em indivíduos com sorologias positiva e negativa para *T. cruzi* e com as formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica. Ainda, associar a presença do alelo polimórfico com a presença de infecção e/ou forma clínica apresentada pelo indivíduo, comparar os níveis de LT- α produzidos por PBMC de indivíduos com os diferentes formas clínicas e genótipos do polimorfismo e avaliar o principal subtipo de linfócito T produtor de LT- α por meio de citometria de fluxo. Não foi observada associação entre o genótipo apresentado pelo indivíduo e o gênero, a sorologia e a forma clínica cardíaca ou indeterminada. Porém, quando foi calculada a razão das chances (OR), observou-se um risco de 2,8 vezes maior para os portadores do genótipo GG e de 2,4 vezes para os portadores do genótipo GA, em relação aos portadores do genótipo AA. Além disso, o alelo G foi mais frequente entre os indivíduos com a forma cardíaca da doença. Há um risco de 2,4 vezes maior de portadores do alelo G desenvolver a forma cardíaca em relação aos não portadores. Considerando-se a produção de LT- α por PBMC, essa citocina é produzida em maiores quantidades após 120 horas de cultura (basal ou após estímulo com antígenos de *T. cruzi*). Indivíduos soropositivos para *T. cruzi* produzem mais LT- α , na presença do antígeno, do que os indivíduos soronegativos, em cultura de 48 horas. Em cultura de 120 horas, há maior produção basal e após estimulação por PHA, nesses indivíduos. Indivíduos com a forma cardíaca produzem mais LT- α do que indivíduos com a forma indeterminada, após estimulação com antígenos de *T. cruzi*, em cultura de 48 horas. Não houve diferença na produção da citocina entre os diferentes genótipos do polimorfismo estudado. Apenas nos indivíduos com sorologia positiva foram observados níveis mais elevados na presença do alelo G, concordando com dados da literatura. Linfócitos T CD8⁺ expressaram mais LT- α do que os linfócitos T CD4⁺, na ausência de estímulo e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. A presença do antígeno diminuiu a expressão de LT- α por linfócitos T CD4⁺, sugerindo a presença de mecanismos reguladores. A LT- α é expressa predominantemente por linfócitos T CD8⁺ na ausência de estímulos e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. Esse estudo apresenta resultados genéticos e biológicos que colocam a LT- α como uma citocina importante no desenvolvimento da forma cardíaca da doença de Chagas.

Palavras-chave: doença de Chagas, polimorfismo genético, linfotóxina alfa.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is the parasitic disease considered of the greatest impact in Latin America. It has an acute and a chronic phase. The chronic phase is characterized by the indeterminate, cardiac, digestive, mixte and nervous clinical forms. The reason for the development of one form or another is not yet known. It is speculated that host and parasite genetic factors can contribute to this. For the host genetic factors, several genes could be elected as candidates, especially those of cytokines. Thus, in this study, the gene of lymphotoxin alpha (LT- α) was examined. LT- α is an inflammatory cytokine, important in the organization and maintenance of the inflammatory process, the arrangement of cells at the site of inflammation and by stimulating molecules of adhesion, such as VCAM, ICAM and E-selectin. Furthermore, it is located in a highly polymorphic region of the chromosome 6. Although few studied in Chagas disease, in experimental models, a direct action on trypomastigotes was demonstrated and in humans a correlation of haplotypes (LTA +80 C / +252 G) with the development of cardiac form. The aims of this study was to identify the frequency of polymorphism in the LT- α gene, position +252, in subjects with positive and negative serology for *T. cruzi* and in patients with cardiac and indeterminate clinical forms of chronic Chagas disease. Also, to associate the presence of the polymorphic allele with the presence of infection and/or clinical form presented by the individual, to compare the levels of LT- α produced by the different genotypes of the polymorphism and clinical forms and to evaluate the main subtype of T lymphocyte by flow cytometry. There was no association between the genotype and gender, serology or clinical form cardiac or indeterminate presented by the individual. However, when it was calculated the Odds Ratio (OR), there was a risk of 2.8 times higher for carriers of the GG genotype and 2.4 times for people with genotype GA, comparing with carriers of AA genotype. Furthermore, the G allele was significantly more frequent among individuals with the cardiac form. There is a risk 2.4 times higher for carriers of the G allele develop the cardiac form compared to individuals that carry the A allele. Considering the production of LT- α by PBMC, this cytokine is produced in larger quantities after 120 hours of culture (basal or after stimulation with antigens of *T. cruzi*). Seropositive individuals for *T. cruzi* produce more LT- α seronegative individuals in 48 hours culture. In 120 hours culture, there is increased production baseline and after stimulation by PHA in these individuals. Individuals with cardiac form produce more LT- α than individuals with the indeterminate form, after stimulation with antigens of *T. cruzi* in 48 hours culture. There was no difference in cytokine production between the different genotypes of the polymorphism studied. Only individuals with positive serology produced higher cytokine levels in the presence of the G allele, in agreement with literature data. CD8⁺ T lymphocytes expressed more LT- α without stimulation and after stimulation with antigens of *T. cruzi*. The presence of the antigen reduced the expression of LT- α by CD4 T lymphocytes, suggesting the presence of regulatory mechanisms. LT- α is expressed predominantly by CD8⁺ T lymphocytes in the absence of stimulation and after stimulation with *T. cruzi* antigens. This study presents genetic and biological results that place the LT- α as an important cytokine in the development of cardiac form of Chagas disease.

Keywords: Chagas disease, genetic polymorphism, lymphotoxin alpha.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

A **Deus**, pelo grande amor, pela vida, pelas infinitas bênçãos, especialmente de ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho. Por poder te conhecer e te admirar pelas maravilhas da ciência, pela proteção constante e por hoje eu te sentir parte de mim ("... e meu coração fica inquieto até repousar em ti...")

À minha mãe Arlete e seu grande amor, pela companhia constante em todos os momentos da minha vida, pelas palavras de incentivo, pelas palavras que me permitiram melhorar, por sempre me indicar o caminho e me levar a refletir. Meu amor e minha gratidão!

Ao meu pai, José, pelo amor, dedicação, incentivo e pelas poucas palavras nos momentos certos.

Ao meu irmão Juliano, pelo carinho.

Ao meu orientador professor Virmondês, por tornar possível eu estar aqui hoje, pelo exemplo de dedicação, paciência, competência, pelo carinho e incentivo tão necessários ao longo de todos esses anos. Obrigada por contribuir tanto com minha formação profissional e pessoal. Meu carinho sempre!

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Ao Felipe, pelo carinho, pelo estímulo, pelo sorriso, pelo companheirismo... Obrigada por ter chegado a tempo de estar aqui.

Às pessoas que se dispuseram a participar deste estudo. Pela contribuição desprendida, meus agradecimentos sinceros.

Aos meus amigos queridos e especiais: Cristiane, Glenda, Karine, Mariana, Rafael Nunes, Sandra, Tânia, Tércio pela amizade linda e carinho.

Aos meus amigos do laboratório de Imunologia: Amanda, Ana Cristina, Bethanea, Betânia, Carlos, Cláudia Renata, professora Denise, Juliana, Lilian, Mônica, Marcos Lira, Marcos Vinícius, Rafael, Tatiana e Thaís.

Às professoras da disciplina de Genética, Marly e Roseane por compreenderem o tumulto pré-defesa, pela paciência, carinho e apoio constantes. Meus agradecimentos sinceros!

Aos meus amigos da disciplina de Genética, Elaine, Ricardo e Vera, pelo carinho e pela acolhida.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Ao amigo Gabriel pela ajuda valiosa e carinhosa com a análise estatística.

Ao Maurício Laguno pela ajuda fundamental na atualização do banco de dados.

A todos os professores da UFTM pelos ensinamentos durante esses 10 anos de UFTM.

Aos funcionários da biblioteca pela dedicação e carinho.

A Denise e Nelma do Curso de Pós Graduação em Patologia pela eficiência, carinho e disponibilidade com que cuidam de tudo.

À CAPES e à UFTM pelo apoio financeiro.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

%	Porcentagem
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
A	Base nitrogenada adenina
Abs	Absorbância
Arg	Arginina
Asp	Aspartato ou ácido aspártico
BAT1	Gene anti-inflamatório
BF.S	Tipo de polimorfismo no sistema complemento
bp	Pares de Base
BSA	Soro albumina bovina
C	Base nitrogenada citosina
C3F	Tipo de polimorfismo no sistema complemento
CCC	Cardiopatia Chagásica Crônica
CCL2	Proteína Quimioatraente de Monócito-1
CCR2	Receptor de quimiocinas 2
CCR5	Receptor de quimiocina 5
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHP	Complexo de Histocompatibilidade Principal
CI	Intervalo de confiança
CXCR3	Receptor de quimiocinas 3
Cy	Cyochrome
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodietanolamina-tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	<i>Fluorescei isotiocyanate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G	Base nitrogenada guanina
g	Gramas
Gal-1	Galectina 1
GLN	Glutamina

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Gly	Glicina
HCL	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ICAM	<i>Intracellular cell-adhesion molecule</i>
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IKBL	Gene inibidor do tipo kappa B
IL	Interleucina
Ile	Isoleucina
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzida
IP-10	Proteína 10 Induzível por Interferon Gama
Kb	quilo base
kD	Quilo Dáton
LGALS2	Gene da galectina 2
LIGHT	Ligante induzível relacionado à linfotoxina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT- α	Linfotoxina alfa
LT- β	Linfotoxina beta
LT- β R	Receptor de linfotoxina beta
LTA	Linfotoxina alfa
LTA	Linfotoxina alfa
MAdCAM-1	<i>Mucosal addressin cellular adhesion molecule</i>
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócito 1
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MIG	Monocina Induzida por IFN- γ
mL	Mililitro
mLT- α	Linfotoxina alfa murina
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
mRNA	RNA mensageiro
mTNF- α	Fator de necrose tumoral alfa murino

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

n mol	Nano mol
NaOH	Hidróxido de Sódio
NF κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Células <i>natural killer</i>
NOS2	Sintase do óxido nítrico
NRAMP1	<i>Natural resistance-associated macrophage protein 1</i>
°C	Graus Celsius
OPD	1,2 ortofenilenodiamino
OR	<i>Odds ratio</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
P	Proteínas ribossomais
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeritrina
pg	Picograma
PHA	Fitohemaglutinina
PNAd	<i>Peripheral node addressin</i>
RIP-LT	<i>Rat insulin promoter-LT</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RPMI	<i>Instituto Roswell Park Memorial</i>
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio eletroforese em gel de poliacrilamida
SLC	<i>Side scatter</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SRBC	Células vermelhas de sangue de carneiro
T	Base nitrogenada timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TDT	Teste de desequilíbrio de transmissão
TE	Tris-EDTA
Th1	Linfócito T <i>helper</i> (auxiliar) 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> (auxiliar) 2
Thr	Treonina

TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta
TNF2	Alelo Polimórfico da Posição -308 da Região Promotora do Gene do TNF- α
TNFa	Microssatélites no gene do TNF- α a
TNFb	Microssatélites no gene do TNF- α b
TNFB1	Alelo do polimorfismo no gene da linfotoxina alfa, posição +252
TNFd	Microssatélites no gene do TNF- α d
TNFe	Microssatélites no gene do TNF- α e
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral do tipo 1
TNFR2	Receptor de fator de necrose tumoral do tipo 2
TRE	elemento forbol-éster responsivo a DNA
U	Base Nitrogenada Uracila
U	Unidade
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UTR	Região não traduzida
UV	Luz ultravioleta
VCAM	<i>Vascular cell-adhesion molecule</i>
x g	Aceleração da gravidade no sistema MKS (9,81m/s ²)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Doença de Chagas	17
1.2. Papel da Resposta Imunológica na Cardiopatia Chagásica Crônica	28
1.3. Genética das Doenças Infecciosas e Polimorfismos Genéticos em Doença de Chagas	37
1.4. Papel Biológico da Linfotoxina Alfa (LT- α) e seus Polimorfismos Genéticos	44
1.5. Justificativa	56
1.6. Objetivos	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1. Amostra de Estudo	59
2.2. Meio RPMI	60
2.3. Meio Schneider's	60
2.4. Obtenção de Antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
2.5. Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)	61
2.6. Análise da Expressão de CD4, CD8 e LT- α por Citometria de Fluxo e Aquisição de Dados	62
2.7. Quantificação de LT- α por ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	63
2.8. Genotipagem	64
2.8.1. Lise de Células	64
2.8.2. Extração de DNA Genômico	65
2.8.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	67
2.8.4. Análise de Restrição	68
2.8.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	68
2.9. Análise dos Dados	70
3. RESULTADOS	71
3.1. Descrição da Amostra	72
3.2. Genotipagem	74
3.3. Produção de LT- α por Células Mononucleares de Sangue Periférico	80
3.4. Expressão de LT- α por Linfócitos T	93
4. DISCUSSÃO	97
5. CONCLUSÃO	106
6. REFERÊNCIAS	109

1.1. Doença de Chagas

Na década de 90, a doença de Chagas foi considerada pelo Banco Mundial como a doença parasitária mais séria na América Latina, com impacto sócioeconômico consideravelmente maior do que os efeitos combinados de outras infecções parasitárias (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002). A doença, cujo agente etiológico é *Trypanosoma cruzi*, foi descrita em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas (CHAGAS, 1909) e é endêmica na América Latina (MONCAYO, 2003). É estimado que a prevalência total da infecção humana por *T. cruzi* em 18 países endêmicos alcance 17 milhões de casos. Aproximadamente 100 milhões de pessoas (25% dos habitantes da América Latina) estão sob risco de infecção (MONCAYO, 2003).

A história natural da doença de Chagas começa há milhões de anos como uma doença enzoótica em animais silvestres, que ainda persiste em áreas como a região Amazônica desta forma. Quando o homem se aventura nos ecótipos naturais da infecção, ela começa a ser transmitida acidentalmente como uma antropozoonose. Como resultado do desmatamento para a agricultura e pecuária na América Latina nos últimos 200 a 300 anos, os triatomíneos, hospedeiros invertebrados da doença, ficaram sem alimento e começaram a colonizar áreas ao redor e dentro dos domicílios humanos. Esses insetos se tornaram adaptados ao novo nicho, alimentando-se de sangue humano e de animais domésticos como uma zoonose (COURA, 2007). *T. cruzi* pode transpassar os vetores e ser transmitido ao homem por mecanismos alternativos, principalmente, transfusão sanguínea, transmissão congênita, sendo esta bem mais frequente do que indica a literatura médica (BITTENCOURT, 1963), infecção acidental em laboratórios, transplante de órgãos e via oral (BRENER, 1987).

Independentemente da forma de infecção, as formas tripomastigotas penetram em uma variedade de células, principalmente as musculares lisas e estriadas, e macrófagos.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Depois da invasão celular, os tripomastigotas são contidos dentro de uma estrutura conhecida como vacúolo parasitóforo, do qual eles subseqüentemente escapam, diferenciando-se em amastigotas, replicando-se livremente no citosol e transformando-se novamente em tripomastigotas. Os flagelados, então, rompem a célula do hospedeiro e após circularem no sangue por um período variável de tempo, alcançam outras células e continuam seu ciclo intracelular. A interação *T. cruzi*-célula do hospedeiro envolve um processo complexo de reconhecimento mútuo mediado por receptores de membrana, principalmente glicoproteínas e carboidratos (ANDRADE, 1958; BRENER, 1987; ANDRADE; ANDREWS, 2005).

Devido a um programa coordenado de vários países do Cone Sul a transmissão da doença de Chagas por vetores e por transfusão de sangue foi interrompida no Uruguai em 1997, no Chile em 1999 e em 8 dos 12 estados endêmicos do Brasil em 2000. Ainda, a incidência de novas infecções por *T. cruzi* no continente inteiro diminuiu em mais de 70% (MONCAYO, 2003).

Depois de adquirida, distinguem-se duas fases na doença de Chagas: a aguda e a crônica (CHAGAS, 1911). Após a infecção, os indivíduos passam pela fase aguda que dura aproximadamente dois meses e é caracterizada pelo alto número de parasitos na corrente circulatória e nos tecidos. Caracteriza-se por febre, mal estar, edema, hepatoesplenomegalia, infartamento ganglionar generalizado e taquicardia (LARANJA et al., 1956; ANDRADE, 1958). A multiplicação exponencial do parasito resulta em um aumento gradual da parasitemia geralmente detectada pelo exame a fresco. A maioria dos pacientes é capaz de desenvolver uma resposta imune que controla a proliferação dos parasitos, tornando a parasitemia subpatente (BRENER, 1987).

Às vezes, o início da infecção é acompanhado de sintomas e sinais locais, decorrentes da penetração do parasito e representado pelo sinal do olho (sinal de

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Romaña) ou pelo chagoma de inoculação, com formação de uma lesão exsudativa proliferativa, acompanhada de reação ganglionar satélite (LARANJA; DIAS; NOBREGA, 1948; ANDRADE, 1958). Essa fase apresenta um curto curso clínico e reações inflamatórias nos tecidos parasitados (DIAS, 1984). As lesões da fase aguda são caracterizadas pela presença de reações inflamatórias localizadas, com predomínio de células mononucleares no local de ruptura de pseudocistos, ocasionalmente com formação de granulomas localizados principalmente nos músculos e tecido cardíaco. Em certos casos, pode haver hiperplasia linforeticular nos glânglios linfáticos, fígado e baço e a presença de macrófagos invadidos pelo parasito. Em outros casos, ou concomitantemente, pode haver miocardite aguda difusa, com edema intersticial, hipertrofia de fibras do miocárdio e dilatação de cavidades cardíacas (ANDRADE, 1958; COURA, 2007). O principal tecido acometido é o cardíaco, cuja manifestação é a miocardite grave, relacionada com a presença de parasitos intracelulares (ANDRADE, 1982; PRATA; MACÊDO, 1984; PRATA, 2001). Foi descrita, também, uma forma em que os sintomas são brandos e os pacientes são aparentemente imunorregulados (BRENER, 1987).

Os sintomas e sinais da infecção inicial são, em regra, transitórios, regredindo parcial ou totalmente após os primeiros meses de doença (geralmente, depois de dois a quatro meses). Alguns doentes morrem durante essa fase (quase sempre crianças), com manifestações de meningoencefalite ou de insuficiência cardíaca ou, de ambas. Sem tratamento, a mortalidade decorrente dessas causas é de cerca de 5 a 10% (PRATA, 2001; DUTRA; GOLLOB, 2008). Na maioria, porém, a doença se desenvolve de maneira favorável, passando a uma fase de cronicidade mais ou menos assintomática (LARANJA; DIAS; NOBREGA, 1948). Há evidência de cura espontânea da doença. Uma paciente, apresentando quadro clínico febril compatível com a forma aguda da

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

tripanossomiase e exame de gota espessa positivo, nunca mais apresentou evidências sorológicas ou parasitológicas da infecção por *T. cruzi* em variadas oportunidades (DIAS et al., 2008).

Transcorridos de dois a quatro meses, as manifestações clínicas agudas desaparecem e os parasitos são raramente detectados no sangue periférico, podendo apenas haver essa possibilidade por meio de métodos parasitológicos de xenodiagnóstico e hemocultura (BRENER, 1987). O parasitismo tissular é raro. Pode ser observado quando técnicas, tais como imunohistoquímica, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *in situ* ou PCR padrão são aplicadas para a detecção de *T. cruzi* nos tecidos doentes de hospedeiros com infecção crônica (TARLETON; ZHANG, 1999). A progressão para a fase crônica é simultânea ao estabelecimento de uma relativa eficiência do sistema imunológico, que torna os níveis de parasitemia subpatentes em todos os indivíduos imunocompetentes (DUTRA; GOLLOB, 2008). Embora a parasitemia esteja drasticamente reduzida, é durante a fase crônica que a maioria dos sintomas da doença de Chagas pode ocorrer (DUTRA; GOLLOB, 2008). Geralmente, a fase crônica começa com um longo período assintomático, chamado de forma indeterminada, que acomete a maioria dos indivíduos (50 a 60%) e persiste de dez a trinta anos ou por toda a vida (BRENER, 1987). Aproximadamente um terço de todos os indivíduos com a forma indeterminada desenvolverá manifestações clínicas da doença de Chagas crônica (TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006). Cerca de 20 a 30% desenvolvem, após 10 a 20 anos de infecção, miocardiopatia de gravidade variável; finalmente, 8 a 10% apresentam a forma digestiva, caracterizada por dilatações do esôfago e/ou cólon (megaesôfago e megacólon, respectivamente). Os demais pacientes apresentam associação das manifestações cardíaca e digestiva, conhecida como forma mista ou cardiodigestiva (BRENER, 1987).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Chagas (1911) fez uma classificação dos casos de infecção crônica em cinco formas clínicas: formas pseudomixedematosa (presença de sinais leves de hipotireoidismo), forma mixedematosa (a insuficiência glandular era mais acentuada), forma cardíaca, forma nervosa e formas crônicas com exarcebações agudas. Posteriormente, achou conveniente agrupar os pseudomixedematosos na forma crônica indeterminada, para indicar a ausência de síndrome clínica predominante (CHAGAS, 1916), introduzindo, então, a utilização desse termo.

Assim, a **forma indeterminada** da doença de Chagas crônica tem grande importância epidemiológica em áreas endêmicas. Durante o período assintomático, os indivíduos podem ser considerados como pertencentes à categoria de cardíacos em potencial (ANDRADE, 1958; ANDRADE, 1982; DIAS, 1989). Essa fase é caracterizada por positividade de exames sorológicos e/ou parasitológicos, ausência de sintomas e/ou sinais da doença, eletrocardiograma convencional normal e coração, esôfago e cólons radiologicamente normais. Esses critérios estão de acordo com a *Validade do Conceito de Forma Indeterminada da Doença de Chagas*, apresentados em 1985.

Todavia, foi detectada a presença de parasitos, necrose, infiltrado inflamatório e fibrose em biópsias de endocárdio de pacientes chagásicos da Venezuela, cujas funções clínicas e eletrocardiográficas mostravam-se normais (GUERRA et al., 1987; AÑEZ et al., 1999). De acordo com esses achados, o conceito da forma indeterminada torna-se questionável. Concordando com esses resultados, Barreto et al. (1990) afirmaram que todos os portadores da forma indeterminada apresentam algum comprometimento cardíaco, embora as alterações detectadas foram de pequena magnitude e o dano cardíaco pouco acentuado.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

A evolução clínica de pacientes com a forma indeterminada é geralmente lenta e benigna. Em longo prazo, a evolução desses pacientes é favorável, e eles, geralmente, morrem de outras causas (DIAS, 1989).

Outra manifestação clínica da doença é a **forma cardíaca**, anatomicamente caracterizada pela localização das lesões no tecido cardíaco. Aparece mais comumente em indivíduos entre 20 e 30 anos, geralmente transcorridos de 10 a 20 anos da fase aguda. Os pacientes cardíacos desenvolvem uma miocardiopatia de variável gravidade clínica, expressa por uma grande variação de manifestações, de pequenas alterações eletrocardiográficas a insuficiência cardíaca ou morte súbita. Algumas diferenças em sua forma de apresentação são observadas de acordo com a área geográfica que se analisa. Assim, existem regiões nas quais a maioria dos casos se desenvolve em miocardite crônica, com manifestações clínicas precoces (menos de 10 anos) e sua evolução até os estágios terminais é mais rápida. Ao contrário, em outras regiões, as manifestações cardíacas são mais tardias, em menores porcentagens e a evolução é mais lenta. Em alguns pacientes observam-se alterações eletrocardiográficas (bloqueio de ramo direito e/ou hemibloqueio anterior) que permanecem invariáveis por 20 a 30 anos, sem que novas anormalidades apareçam. Não se conhece qual a verdadeira razão dessas diferenças, embora se acredite que dependam das características patogênicas de diferentes cepas e/ou de aspectos relativos à relação parasito-hospedeiro (ELIZARI, 1999). Nesse estágio, os parasitas dificilmente são encontrados no coração e outros órgãos (BRENER, 1987). Das evidências reunidas de estudos em modelos animais e em humanos, quatro principais mecanismos patogênicos poderiam explicar o desenvolvimento dessa manifestação da doença de Chagas: disautonomia cardíaca, distúrbios microvasculares, danos ao miocárdio dependentes do parasito e mediados pelo sistema imunológico (MARIN-NETO et al., 2007).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Sabe-se que a miocardiopatia chagásica crônica é a forma de cardiopatia específica mais frequente no mundo e trata-se de uma doença cardíaca progressiva e irreversível (praticamente em 100% dos casos) e é altamente incapacitante (ELIZARI, 1999).

Os achados de autópsias variam com a sintomatologia. Quando não há insuficiência cardíaca, o coração pode estar normal ou pouco aumentado. O único achado macroscópico pode ser o estreitamento do ápice do ventrículo esquerdo, que pode apresentar um aneurisma. É diferente do aneurisma arterosclerótico (pós-infarto), por não ser formado por tecido cicatricial (PRATA, 2001). Em áreas endêmicas, essa lesão ocorre em 19% dos pacientes chagásicos (PRATA, 2001). A miocardite e a fibrose podem ser focais ou difusas. Lesões do sistema de condução são frequentes e geralmente fibróticas, características encontradas em casos de morte súbita (ANDRADE; LOPES; PRATA, 1987; PRATA; MACÊDO, 1984).

A presença de distúrbios de condução intraventricular, tais como o bloqueio de ramo direito, ou o hemibloqueio anterior constituem um marcador altamente sensível para o diagnóstico da miocardite chagásica crônica (ELIZARI, 1999).

Quando a insuficiência cardíaca está presente, principalmente após um período de descompensação, o coração torna-se hipertrofiado e apresenta dilatação em todas as câmaras. A congestão passiva predomina no sistema circulatório. Fenômenos tromboembólicos e estreitamento do ápice cardíaco são comuns. A miocardite é intensa. Há hipertrofia de fibras cardíacas, associada com áreas de necrose e degeneração hialina, fibrose focal ou difusa e edema. A cardiopatia chagásica pode ser sintomática ou assintomática. A forma assintomática só é detectada após eletrocardiograma em exames periódicos, não causando qualquer alteração na rotina desses pacientes. Entretanto, nesses casos, pode ocorrer morte súbita (PRATA; MACÊDO, 1984).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

O conceito de morte súbita em doença de Chagas é variável. Devem-se considerar como chagásicos falecidos subitamente aqueles indivíduos cujo óbito ocorre repentinamente e que antes não apresentavam sintomas e/ou sinais da doença (LOPES et al., 1975). Esta é uma característica comum da doença de Chagas crônica, acometendo aproximadamente 38% dos pacientes com ou sem insuficiência cardíaca congestiva (PRATA, 2001). De modo geral, o coração do chagásico falecido subitamente apresenta grau normal ou se mostra ligeiramente alongado. Nos chagásicos com insuficiência cardíaca congestiva a forma é, em geral, globosa ou cônica. Microscopicamente, o exame dos corações desses indivíduos mostra, a exemplo do que ocorre nos tripanossomóticos com outros tipos de óbito, que a lesão fundamental é o processo inflamatório crônico que acomete epicárdio, miocárdio e endocárdio. Portanto, o substrato histopatológico observado é o de uma cardite crônica (LOPES et al., 1975; LOPES et al., 1981).

A cardiopatia chagásica crônica é resultante de dano miocárdico progressivo consequente a incessante miocardite fibrosante. Essa forma tem como substrato anatômico fundamental um processo de miocardite crônica difusa, progressiva, que destruindo o miocárdio leva a uma dilatação global das cavidades cardíacas, traduzindo-se clinicamente em uma **insuficiência cardíaca congestiva (ICC)**, predominantemente ventricular direita. A miocardite crônica difusa é caracterizada por uma infiltração difusa de células mononucleares, na qual predominam as células linfóides. Além disso, o infiltrado tende a mostrar áreas de adensamentos focais, muitas vezes em correlação com focos de destruição tecidual, há fibrose intersticial que tende a envolver a fibra cardíaca, há congestão e edema de todo o miocárdio, nota-se extrema escassez ou ausência de parasitos intracelulares (ANDRADE, 1982; ALMEIDA et al., 1984). O processo lesa, quase sempre, o miocárdio e também cria condições para o

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

aparecimento de trombozes intracardíacas. Arritmias e acidentes tromboembólicos ocorrem, assim, no curso da doença (ANDRADE, 1958). Ainda, pode-se observar que nos chagásicos com ICC, o grau de desnervação foi em geral menor do que nos pacientes sem ICC. Além disso, a desnervação parassimpática do coração não guardou relação com a hipertrofia do miocárdio ou com a ICC (ALMEIDA et al., 1987).

Comparando-se a miocardiopatia chagásica com a miocardiopatia dilatada, conclui-se que a presença de fibrose, hipertrofia e processo inflamatório de grau moderado ou intenso são sugestivos, mas não patognomônicos da doença de Chagas. Por outro lado, miocardiopatia dilatada é mais frequentemente associada à menor fibrose ou hipertrofia e à presença de processo inflamatório de grau discreto. O aspecto do processo inflamatório tende a ser difuso na miocardiopatia dilatada e na doença de Chagas ele é multifocal (BARRETTO et al., 1989).

Ainda, a doença de Chagas crônica pode acometer o trato digestivo, especialmente esôfago e cólon, e o sistema nervoso. Na forma digestiva, uma das manifestações mais precoces do megaesôfago é a incoordenação dos movimentos peristálticos do esôfago, que mais tarde são seguidos por dilatação, disfagia e sintomas relacionados. Constipação prolongada é o principal sintoma do megacólon, que apresenta diferentes graus de dilatação (BRENER, 1987).

No megaesôfago e megacólon há sempre algum grau de destruição do sistema nervoso autônomo, que precede as alterações de motilidade. Há grave desnervação na presença de esôfago de calibre normal. Existem lesões nas camadas musculares, mas não se sabe se são primárias ou secundárias (KÖEBERLE, 1957; PRATA, 2001).

As principais manifestações clínicas encontradas na forma digestiva são a disfagia, odinofagia (dor à deglutição dos alimentos), regurgitações, epigastralgia, dispepsia, hipertrofia das parótidas, discinesia esofagiana, alterações morfológicas e desordem

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

motora do arco duodenal, alterações do trânsito intestinal, meteorismo (acúmulo de gases no abdomen) e constipação intestinal (REZENDE, 1959).

Há casos em que há associação de “megas” com a cardiopatia chagásica crônica, sendo esta chamada de **forma mista** (PORTO; PORTO, 1959; CHAPADEIRO et al., 1964). Chapadeiro et al. (1964) observaram que o total de “megas” associados à cardiopatia chagásica foi de 17,3%.

O envolvimento do sistema nervoso foi descrito primeiramente por Chagas (1911). Mello e Mello (1955) descreveram um caso de encefalopatia infantil, de forma hemiplégico-espasmódica, que por diagnóstico de exclusão, foi incluído na **forma nervosa** crônica da doença.

Em nenhuma outra doença infecciosa o envolvimento do sistema nervoso autônomo é tão importante quanto na doença de Chagas, o que é demonstrado pela presença de lesões, desnervação e desordens funcionais. A desnervação do sistema parassimpático está mais bem documentada e é mais intensa do que do sistema simpático (DeFARIA; REZENDE; RASSI, 1988; PRATA, 2001). A destruição ocorre, preferencialmente, em neurônios periféricos e é mais frequentemente observada na fase aguda, provavelmente persistindo durante a crônica, sendo mais evidente nas formas cardíacas e digestivas do que na forma indeterminada. No sistema nervoso periférico, observa-se uma neurite bem individualizada. O envolvimento do sistema nervoso central está bem estabelecido na fase aguda, na meningoencefalite e na imunodepressão (DeFARIA; REZENDE; RASSI, 1988; PRATA, 2001).

Acredita-se que o sistema nervoso central também é acometido na doença de Chagas crônica. *T.cruzi* parasita células gliais e produz reação inflamatória quando há ruptura de ninhos de amastigotas. A encefalopatia chagásica crônica acomete uma minoria de indivíduos (5 para cada 1000 pacientes portadores de cardiopatia manifesta)

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

e apresenta-se clinicamente com sinais e sintomas inespecíficos (PITTELLA, 1996). No entanto, o envolvimento do sistema nervoso central na fase crônica da doença de Chagas, demonstrado por anormalidades morfológicas e funcionais é ainda objeto de discussão. Neuropatias periféricas não afetam todos os pacientes e são geralmente subclínicas e não incapacitantes (WACKERMANN et al., 2008).

Como é possível perceber, a doença de Chagas crônica apresenta ampla variedade de formas clínicas, desde a aparente ausência de sintomas da forma indeterminada até as manifestações graves observadas na forma cardíaca da doença. A razão de os pacientes infectados por *T. cruzi* progredirem para as distintas formas clínicas não é conhecida. Fatores como a cepa do parasito e seu tropismo tissular, carga parasitária, tempo de infecção, natureza da *resposta imunológica* apresentada e a *genética do hospedeiro* desempenham papel importante (DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA; 2005; DUTRA; GOLLOB, 2008).

Nesse aspecto, é interessante observar a relativa importância atribuída ao parasito *versus* hospedeiro no que tange as explicações para a evolução patogênica da doença. Historicamente, três fases distintas podem ser levantadas. A primeira, chamada “fase do parasito”, corresponde ao período imediatamente posterior à descrição da doença, quando não havia dúvidas do papel de *T. cruzi* na patogênese. Nesse período, houve uma intensa, mas não produtiva busca por métodos biológicos e bioquímicos e marcadores capazes de estabelecer uma ligação entre a variabilidade de parasito e a forma clínica da doença. A falha em se obter alguma associação entre o parasito e a forma clínica desenvolvida pelo paciente somada à escassez de parasitos no sangue periférico e tecidos dos pacientes sintomáticos levou à fase da autoimunidade. Nesse segundo período, a importância patogênica do parasito foi relegada a segundo plano, exceto pelas evidências de reatividade cruzada do hospedeiro com epítopos do parasito

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

(CUNHA-NETO et al. 1995; ABEL; KALIL; CUNHA-NETO, 1997). A descoberta de técnicas mais sensíveis para a detecção de *T. cruzi* recuperou o papel primário do parasito na patogênese da doença de Chagas. Atualmente, experimenta-se a terceira fase, a fase genômica, na qual a doença é vista como uma interação entre as duas variáveis e os genomas coenvolvidos: o genoma do parasito e o genoma humano (MACEDO et al., 2004).

Essa visão sugere que as diferentes formas clínicas da doença de Chagas podem ser explicadas por variações no tropismo tissular, um processo que é influenciado por fatores genéticos do parasito e do hospedeiro (MACEDO; PENA, 1998; VAGO et al., 2000; ANDRADE et al., 2002).

1.2. Papel da Resposta Imunológica na Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC)

O principal objetivo dos estudos de imunidade a *T. cruzi* é o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na resistência a este protozoário, bem como a patogênese da doença de Chagas (BRENER; GAZZINLELLI, 1997).

O sistema imune participa de maneira complexa na doença de Chagas. Parece que particularmente nos estágios iniciais a resposta imune é protetora. No entanto, o tripanosoma é capaz de escapar das defesas imunológicas do hospedeiro e sobreviver, apesar de uma reação imune contínua que se desenvolve. Na fase crônica, a resposta imune pode ter uma conotação danosa para o hospedeiro, por meio de significativo componente autoagressivo (ABATH, 1983).

Por algum tempo, acreditou-se que o desenvolvimento das manifestações clínicas cardíacas era resultado da presença do parasito. No entanto, a desproporção verificada entre a presença de parasitos e a magnitude das lesões evolutivas, nos casos da forma crônica da doença, suscitou outras hipóteses patogênicas não diretamente relacionadas

ao parasito. A teoria alérgica com lesão tissular a distância, pela liberação de antígenos parasitários, deu melhor compreensão aos achados anatomopatológicos nos casos crônicos. A reinfecção exógena ou a constante reinfecção pelos ciclos endógenos parasitários, acompanhadas da lise dos parasitos no hospedeiro, constitui fonte antigênica suficiente para justificar a eclosão sucessiva e ininterrupta de lesões exsudativas ou produtivas de caráter granulomatoso, sobretudo no coração (CARVALHAL, 1977). Nenhuma hipótese patogênica se ajustava tão bem como esta para explicar a patogenia da forma crônica da doença. Entretanto, segundo Prado (1959) devia haver algum “elo perdido” tão grandes são as diferenças clínicas, imunológicas e anatomopatológicas entre a fase aguda parasitária e a fase crônica, oligo ou mesmo sem parasitos.

Foi proposta, então, a teoria das patias chagásicas parassimpaticoprivas na qual se acreditava ter-se resolvido o “elo perdido”. A doença no coração ou em outros órgãos cavomusculares, expressa nos graus variáveis de lesão dos plexos mioneurais, poderia prosseguir com ou sem parasitos, por meio de um mecanismo perpetuador que explicaria a renovação dos processos lesivos por um mecanismo distinto, simultâneo à ação de parasitos, mas, também, sozinho, autossuficiente, quando não mais fossem os parasitos encontrados no hospedeiro infectado (CARVALHAL, 1977).

Apesar dos vários anos de pesquisa e discussão, a causa de doença na infecção crônica por *T. cruzi* permanece foco de constantes debates. Atualmente, outro ponto das discussões é se a doença de Chagas tem caráter autoimune, resultante de uma resposta imune inapropriada a autoantígenos que são induzidos e talvez perpetuados pela infecção por *T. cruzi*, ou se é resultado da incapacidade de controlar a infecção adequadamente ou sem danos constantes pelos 30-40% dos indivíduos infectados que desenvolvem a doença cardíaca (TARLETON, 2003).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

A infecção por *T. cruzi* é a principal causa de doença cardíaca e de mortes relacionadas ao sistema cardiovascular em áreas endêmicas, com aproximadamente 50000 mortes por ano (KIRCHHOFF et al., 2004). Apesar da óbvia importância clínica da CCC e dos esforços de muitos pesquisadores durante o século passado, os mecanismos patogênicos dessa doença ainda são muito pouco compreendidos (CUNHA-NETO et al., 2006).

Há, pelo menos, seis mecanismos propostos para a patogênese da CCC: 1. espasmo microvascular, 2. isquemia, 3. neutrofilia e eosinofilia crônicas, 4. toxicidade mediada pelo parasito, 5. resposta imune anti-*T. cruzi* ou a seus antígenos que persistem no coração, 6. autoimunidade induzida por *T. cruzi* (TANOWITZ et al., 1992; KIERSZENBAUM, 1999; ENGMAN; LEON, 2002; LEON; ENGMAN, 2003). Ainda, os achados de minicírculos de kDNA integrados ao genoma nuclear do hospedeiro de alguns indivíduos com CCC sugere que alterações na expressão gênica do hospedeiro poderiam contribuir para a patogênese (NITZ et al., 2004). A ausência ou a quase ausência de parasitos no tecido cardíaco gravemente inflamado, inicialmente, sugeriu a hipótese da autoimunidade. Descobertas posteriores de uma substancial resposta auto-imune em modelos experimentais e em humanos reforçaram essa idéia (CUNHA-NETO et al., 2006).

Durante o curso da infecção, células T CD4⁺ e CD8⁺ são estimuladas pelos antígenos de *T. cruzi*, expandidas e se diferenciam em células de memória ativadas. A infecção crônica induz uma mudança sistêmica no perfil de citocinas produzidas pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) para o perfil Th1 com supressão do perfil Th2 (CUNHA-NETO et al., 1998; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000; GOMES et al., 2003). A produção aumentada de IFN- γ em pacientes com CCC (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; ABEL et al., 2001; GOMES et al., 2003) quando comparada

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

com indivíduos assintomáticos tem sido associada com a diminuição da produção de IL-10 (GOMES et al., 2003).

Todos os indivíduos cronicamente infectados, até mesmo os assintomáticos, apresentaram níveis plasmáticos aumentados de TNF- α (FERREIRA et al., 2003). Um trabalho avaliando a expressão de citocinas por monócitos de pacientes com CCC e assintomáticos verificou que monócitos de pacientes indeterminados são predispostos a expressar mais IL-10, enquanto os monócitos de pacientes com CCC expressaram TNF- α , após exposição a parasitos vivos. Os resultados sugerem que monócitos de pacientes indeterminados apresentam características moduladoras relacionadas à baixa expressão de HLA-DR e alta expressão de IL-10, enquanto que pacientes cardíacos têm uma resposta inflamatória relacionada à alta expressão de TNF- α (SOUZA et al., 2004). No entanto, um estudo em modelo experimental de CCC mostrou que o bloqueio de TNF- α com Etanercept aumentou a disfunção ventricular esquerda e a ausência de sinalização via TNF pode ser prejudicial para a insuficiência cardíaca na doença de Chagas (BILATE et al., 2007). O perfil de citocinas pró-inflamatórias descrito acima pode estar relacionado com a capacidade de glicoconjugados do tipo mucina originados da infecção persistente por *T. cruzi* induzirem a produção de IL-12 (CAMARGO et al., 1997).

Após a diferenciação, células T efetoras recirculam e entram no coração, onde mediarão a inflamação e a lesão tecidual (DOSREIS et al., 2005). As lesões observadas na CCC são consistentes com um processo inflamatório e remodelamento do miocárdio, que inclui miocardite rica em células T e macrófagos, hipertrofia e fibrose com dano à fibra cardíaca, inclusive pelo processo de apoptose (HIGUCHI et al., 1987; TOSTES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

A expressão local aumentada de IFN- γ e TNF- α (REIS et al., 1997; ABEL et al., 2001), IL-6 e IL-4 (REIS et al., 1997), de moléculas de complexo de histocompatibilidade principal (CHP) classes I e moléculas de adesão (REIS et al., 1993) foram relatadas. Estudo mostrou que linfócitos CD8⁺, expressando granzima A e células expressando TNF- α estavam presentes nas lesões cardíacas de pacientes com doença crônica (REIS et al., 1993). Higuchi et al. (1997) concluíram que os linfócitos T CD8⁺ são o principal tipo celular responsável pela ativação do sistema imune na miocardite chagásica humana e são provavelmente ativados pela presença de antígenos de *T. cruzi* associados com antígenos do miocárdio do hospedeiro. A ausência de um número significativo de células T CD4⁺ na presença de antígenos de *T. cruzi* sugere inibição desse tipo celular ou falta de um mecanismo de apresentação via CHP de classe II (HIGUCHI et al., 1997). É sugerido que a predominância de células T CD8⁺ no miocárdio de indivíduos cronicamente infectados por *T. cruzi* reflete o perfil de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas apresentado pelas células T CD8⁺ circulantes e apontam a possibilidade de que múltiplas moléculas induzíveis por IFN- γ presentes no tecido inflamado contribuem para a gênese e manutenção da miocardite induzida por *T. cruzi* (LANNES-VIEIRA, 2003).

As análises por PCR em tempo real e por *microarray* apontaram que os níveis de expressão gênica de quimiocinas MCP-1, IP-10 e MIG induzidas por IFN- γ , bem como receptores CCR2 e CXCR3 de quimiocinas foram regulados positivamente no tecido cardíaco de pacientes com CCC. Além disso, IFN- γ e MCP-1 aumentaram significativamente os níveis do fator natriurético atrial, um marcador de hipertrofia de miocardiócito e insuficiência cardíaca (CUNHA-NETO et al., 2005).

Um papel direto para o parasitismo cardíaco na patogênese foi proposto após a identificação de antígeno e DNA de *T. cruzi* em corações de pacientes com CCC por

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

técnicas de imunohistoquímica e PCR (JONES et al., 1993; HIGUCHI et al., 1997; FREITAS et al., 2005). No entanto, estudos recentes, usando imunohistoquímica ou hibridização *in situ* para detectar *T. cruzi* no tecido cardíaco de pacientes com CCC, não conseguiram mostrar associação entre a presença do parasito e as lesões inflamatórias, e o DNA de *T. cruzi* tem sido detectado nos corações de pacientes com CCC e assintomáticos (AÑEZ et al., 1999; PALOMINO; AIELLO; HIGUCHI, 2000). Esses achados sugerem que a infecção por *T. cruzi* por si só é aparentemente incapaz de despertar um dano cardíaco suficiente para causar a CCC. Assim, algum outro fator precisa estar operando juntamente com a persistência do parasito para levar um subgrupo de indivíduos infectados por *T. cruzi* ao dano cardíaco (CUNHA-NETO et al., 2006). A partir dessas observações formulou-se a hipótese da autoimunidade (PETRY; EISEN, 1989; SOARES; RIBEIRO DOS SANTOS, 1999; TARLETON; ZHANG, 1999; GIRONÈS; FRESNO, 2000). Deve ser enfatizado que a noção de que a autoimunidade parece ter um papel central no dano ao miocárdio não é incompatível com o papel da persistência do parasito (CUNHA-NETO et al., 2006; BILATE; CUNHA-NETO, 2008), como mostrado pela identificação de respostas autoimunes e respostas de células T específicas contra *T. cruzi* no tecido cardíaco de CCC (CUNHA-NETO et al., 1996; FONSECA et al., 2005; IWAI et al., 2005).

No tocante aos estudos em autoimunidade na doença de Chagas humana, o soro de mais de 80% dos pacientes continha autoanticorpos antineurônio, e há perda de grupos de neurônios do sistema autonômico (RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1979), que pode ser ligada à disfunção do sistema nervoso autonômico observada em pacientes sintomáticos e assintomáticos (MARIN-NETO et al., 1998). Anticorpos funcionais contra receptores adrenérgicos ligados à proteína G e muscarínicos (M2) foram encontrados no soro de pacientes com doença de Chagas (BORDA et al., 1984;

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

PASCUAL; BORDA; STERIN-BORDA, 1987; STERIN-BORDA et al., 1988; GOIN et al., 1991; STERIN-BORDA; GORELIK; BORDA, 1991; GOIN et al., 1994; GOIN et al., 1997; KAPLAN et al., 1997; DE OLIVEIRA et al., 1997; COSTA et al., 2000). Soro de pacientes chagásicos apresenta autoanticorpos contra pequenas ribonucleoproteínas e o autoantígeno humano Cha, bem como de seus epítomos principais em células B (GIRONES et al., 2001; GIRONES et al., 2001). Juntos, esses dados sugerem que autoanticorpos funcionais têm papel na patogênese da doença de Chagas. Por outro lado, o papel patogênico de autoanticorpos que não têm atividade funcional ou não se associam à doença permanece por ser elucidado (RIBEIRO DOS SANTOS et al., 1979; GEA et al., 1993; MCCORMICK; ROWLAND, 1993; TIBBETTS et al., 1994; TEKIEL; MIRKIN; GONZALEZ CAPP, 1997; BACH-ELIAS et al., 1998; BOSETTO et al., 2004). Autoanticorpos contra galectina-1 (Gal-1), uma proteína cardíaca humana, estão correlacionados com a gravidade do dano cardíaco na CCC (GIORDANENGO et al., 2001). Complexos de ataque à membrana foram identificados nas membranas de cardiomiócitos de pacientes com CCC (AIELLO et al., 2002).

Com relação à autoimunidade mediada por células, estudo demonstrou que o tecido cardíaco é capaz de induzir a produção de linfocina (BARROS et al., 1979). Cardiomiócitos não infectados foram alvo de citotoxicidade por PBMC de pacientes com CCC (TEIXEIRA et al., 1978).

Outros estudos têm identificado respostas com reatividade cruzada a antígenos com mimetismo molecular. Devido à conservação evolutiva de sequências primárias de muitas proteínas estruturais importantes ou de enzimas entre protozoários e humanos não surpreende que o fenômeno da reatividade cruzada aconteça (ACOSTA; SADIGURSKY; SANTOS-BUCH, 1983; SANTOS-BUCH et al., 1985; LEVIN et al.,

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

1989; KERNER et al., 1991; LEVITUS et al., 1991; BONFA et al., 1993; MURPHY, 1993; VERMELHO et al., 1997). Evidências de reatividade cruzada entre proteínas ribossomais P0, P1 e P2 de *T. cruzi* e a proteína ribossomal P humana (KAPLAN et al., 1997) e de receptores β 1 adrenérgicos têm sido mostradas (LEVITUS et al., 1991; FERRARI et al., 1995).

Foi mostrado que o reconhecimento de um epítipo com reatividade cruzada entre *T. cruzi* e coração (cadeia pesada da miosina cardíaca) associado fortemente com a presença de lesões crônicas sugere a reatividade cruzada entre a miosina cardíaca e a proteína B13 na patogênese da CCC. Os anticorpos com reatividade cruzada entre miosina-proteína B13 estavam presentes no soro de 100% dos indivíduos com CCC, mas apenas em 14% dos assintomáticos (CUNHA-NETO et al., 1995).

Clones de células T CD4⁺ derivados de biópsias de pacientes com CCC e expandidos na ausência de antígenos exógenos reagiram cruzadamente com a miosina cardíaca (mas não a esquelética) e a proteína B13 de *T. cruzi* (CUNHA-NETO et al., 1996). A sensibilização *in vitro* de linfócitos periféricos de pacientes soronegativos para *T. cruzi*, com a proteína B13 desencadeou reatividade cruzada de clones de células T com a miosina cardíaca (ABEL; KALIL; CUNHA-NETO, 1997). A completa caracterização do reconhecimento da proteína B13 por células T foi realizada e foi observado que o tal reconhecimento é restrito a HLA-DQ7, -DR1 e -DR2 (ABEL et al., 2005).

É importante observar que os níveis de anticorpos antimiosina cardíaca estavam significativamente aumentados nos pacientes com danos cardíacos por causas infecciosas e não infecciosas (DE SCHEERDER et al., 1989; NOMURA et al., 1994), sugerindo que a exposição ao antígeno por si só poderia causar a imunidade antimiosina e causar a CCC (CUNHA-NETO et al., 2006).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

A autoimunidade e a resposta específica a *T. cruzi* secundária à persistência do parasito não são incompatíveis ou mutuamente exclusivas, e é provável que a combinação de ambas deva estar envolvida no estabelecimento das lesões cardíacas. O consenso na comunidade científica é que a inflamação, desencadeada pela presença do parasito ou pela autoimunidade, certamente tem papel na patogênese da CCC (BILATE; CUNHA-NETO, 2008).

Citocinas inflamatórias e quimiocinas são essenciais para o controle imunomediado do parasito. Por outro lado, citocinas regulatórias ou anti-inflamatórias são absolutamente necessárias para contrabalancear os efeitos destrutivos de uma inflamação exarcebada, que, frequentemente, leva ao dano tissular e pode causar a morte do hospedeiro. Coletivamente, os resultados obtidos esclarecem a importância de se manter um balanço entre uma forte resposta imune efetora para eliminar o parasito, e uma resposta imune regulada que ajudará na manutenção da homeostase, evitando o dano tecidual (BILATE; CUNHA-NETO, 2008).

Assim, apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, na tentativa de esclarecer a patogênese da CCC, muitos estudos ainda são necessários. O desenvolvimento da CCC em apenas um terço dos indivíduos infectados aponta para o possível papel da suscetibilidade genética. Esse fato é reforçado pelo encontro de agregação familiar nos casos de CCC (ZICKER et al., 1990). É provável que polimorfismos genéticos envolvidos na resposta imunológica possam influenciar a progressão de alguns indivíduos infectados para a CCC. A associação de polimorfismos com genes da resposta imune está constantemente sob investigação.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

1.3. Genética das Doenças Infecciosas e Polimorfismos Genéticos em Doença de Chagas

Nem todos os indivíduos infectados com um microorganismo desenvolvem doença e os genes humanos têm um importante papel em determinar a resistência ou suscetibilidade à determinada infecção (CASANOVA; ABEL, 2005). A predisposição ou resistência a uma doença infecciosa pode seguir um padrão de herança simples ou complexo (PICARD; CASANOVA; ABEL, 2006).

O desenvolvimento de uma doença infecciosa resulta de uma complexa interação entre o microorganismo, o hospedeiro e o ambiente. Muitos fatores exercem influência na determinação da gravidade e da progressão da doença em indivíduos e na taxa de infecção na população. Como muitos fatores podem contribuir para a determinação do desenvolvimento ou da gravidade das doenças infecciosas, essas são consideradas doenças complexas. Doenças complexas são aquelas que não seguem o padrão de herança mendeliana. Estudos com esse tipo de doença começaram na metade do século 20. Doenças complexas têm sido definidas como poligênicas (envolvendo mais do que um gene), multifatoriais (dependendo da interação de mais de um gene e um ou mais fatores ambientais), oligogênicas (envolvendo mutações em vários genes diferentes de pequeno efeito), e gene principal (um gene principal contribuindo com proporção significativa dos fatores genéticos). O primeiro *locus* de suscetibilidade a uma doença parasitária foi mapeado em 1996, para a esquistossomose (MARQUET et al., 1996). O estudo das doenças infecciosas difere do de outras doenças complexas porque os fatores ambientais envolvidos são conhecidos na maioria dos casos e podem ser incluídos na análise (CLEMENTI; GIANANTONIO, 2006).

Vários estudos têm tentado identificar os fatores que causam o desenvolvimento da doença em apenas uma fração da população exposta aos parasitos. Muita atenção tem sido dada ao ambiente, pois a transmissão do parasito depende sobretudo de fatores

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

ambientais, tais como a densidade e distribuição do vetor e virulência do parasito. Os parasitos, devido ao seu grande genoma, têm desenvolvido mecanismos sofisticados de escape do sistema imune, como a variação antigênica (DESSEIN et al., 2001).

Os microorganismos estão em constante interação com o meio ambiente, respondendo a ele e sendo capazes de alterar o padrão de expressão gênica em resposta a vários sinais ambientais. Esta contínua adaptação leva a uma enorme variação na interação parasito-hospedeiro. A grande maioria destas interações envolve benefícios para o parasito e para o hospedeiro em uma relação simbiótica. O aparecimento da doença é uma exceção a essa regra e resulta de uma complexa interação entre o parasito, o hospedeiro e o ambiente. O papel da variabilidade genética do hospedeiro desperta interesses na suscetibilidade à infecção, em relação a sua gravidade individual, sua progressão e as taxas de infecção em nível populacional (SEGAL; HILL, 2003).

Em seres humanos, a avaliação da suscetibilidade/resistência a infecções significa identificar o papel de fatores genéticos na expressão de fenótipos complexos. Tal papel pode ser estudado por métodos de epidemiologia genética, combinando informações epidemiológicas (medida de fatores de risco) e genéticas (relações familiares entre indivíduos, marcadores genéticos) (ABEL; DESSEIN, 1997).

Nesse contexto, o estudo em doenças infecciosas humanas apresenta muitas vantagens. Primeiro, a influência de fatores ambientais no risco de infecção já é bem conhecida, podendo ser considerada na análise. Além disso, há forte indicação na escolha de genes candidatos por associação ou por estudos de ligação, com base na função (biologia) do gene candidato e seu papel na resposta imunológica ao patógeno estudado, e/ou em estudos de genes homólogos identificados em modelos animais, ou em genes implicados em doenças semelhantes (ABEL; DESSEIN, 1997; SEGAL; HILL, 2003; BURGNER; JAMIESON; BLACKWELL, 2004). Outro aspecto relevante

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

é que o processo de identificação de genes principais envolvidos na resposta a um determinado patógeno oportuniza o estudo de várias características complementares, como fenótipos clínicos (afetado/não afetado), fenótipos biológicos (medida da intensidade da infecção) e fenótipos imunológicos (níveis de anticorpos ou de citocinas) (ABEL; DESSEIN, 1997).

Ainda é preciso considerar que a suscetibilidade genética a infecções raramente segue um simples padrão de herança mendeliana, exceto em raros casos familiares em que os defeitos ocorrem em um único gene. Há duas principais técnicas para mapear e identificar associações genéticas em doenças complexas: estudos de associação e de ligação (SEGAL; HILL, 2003; FRODSHAM; HILL, 2004).

Os estudos de associação, normalmente, precisam ser realizados com um grupo pré-selecionado de polimorfismos em um único nucleotídeo (SNP) (WEISS; TERWILLINGER, 2000) e testam uma associação significativa entre o polimorfismo genético e um fenótipo, dentro de uma população (QUINTANA-MURCI et al., 2007). Os métodos de associação apresentam como limitação a necessidade de identificação prévia de polimorfismos, preferencialmente aqueles de relevância funcional (SEGAL; HILL, 2003; FRODSHAM; HILL, 2004). Entretanto, apresenta grande importância o fato de poderem ser usados em estudos de associação entre afetados e controles, ou dentro de famílias. Em testes de associação familiares, utilizam-se os pais e um filho afetado para testar se um alelo em particular é transmitido mais frequentemente do que seria esperado pela herança mendeliana. Isto é conhecido como teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) (SEGAL; HILL, 2003).

Diferenças entre casos e controles na prevalência de uma doença podem sugerir o papel de fatores genéticos na doença, mas necessitam de grande número de casos e controles. Possuem predisposição ao erro, caso não haja o recrutamento e estratificação

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

adequados da amostra, emparelhamento de fatores ambientais e étnicos. A idade e gênero são menos importantes, pois raramente se alteram em decorrência desses fatores. Outra necessidade é um grande número amostral, a fim de que se possam detectar os efeitos no risco. Estudos de associação têm se tornado bastante frequentes, uma vez que polimorfismos têm sido identificados em genes importantes para a patogênese ou proteção a doenças (SEGAL; HILL, 2003; FRODSHAM; HILL, 2004).

Na doença de Chagas, o achado de agregação familiar de casos de CCC (ZICKER et al., 1990) reforça o papel da genética do hospedeiro nas manifestações da forma crônica cardíaca. É possível, então, que polimorfismos genéticos afetando a resposta imune poderiam influenciar a progressão para a CCC entre os indivíduos infectados por *T. cruzi* (BILATE; CUNHA-NETO, 2008). Vários trabalhos, estudando diferentes genes candidatos, têm sido realizados.

Com relação aos genes do HLA, alguns estudos apontam associação de polimorfismos nesses genes e a progressão para a forma cardíaca da doença e/ou desenvolvimento da infecção crônica (FERNANDEZ-MESTRE et al., 1998; DEGHAIDE; DANTAS; DONADI, 1998; COLORADO et al., 2000; CRUZ-ROBLES et al., 2004) e um estudo não conseguiu confirmar essa relação (FAÉ et al., 2000). Considerando a resistência à infecção, o haplótipo DRB1*14-DQB1*0301 protegeu contra a infecção em uma área altamente endêmica do Peru, sendo uma herança dominante (NIETO et al., 2000).

A comparação da frequência dos alelos DRB1 e DQB1 entre pacientes e controles mostrou uma frequência reduzida de DRB1*14 e DQB1*0303 nos pacientes, sugerindo efeitos protetores independentes na infecção crônica na população estudada. A comparação das frequências alélicas entre pacientes com ou sem cardiopatia mostrou maior frequência de DRB*01, DRB*08 e DQB1*0501 e frequência reduzida de

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

DRB1*1501 nos pacientes com arritmia e insuficiência cardíaca congestiva. Os resultados sugerem que os genes do HLA classe II podem estar associados com o desenvolvimento da infecção crônica e com o dano cardíaco na doença de Chagas (FERNANDEZ-MESTRE et al., 1998). Outro trabalho mostrou que HLA-A30 conferiu suscetibilidade, enquanto HLA-DQB1*06 conferiu proteção contra o desenvolvimento da doença, independente da forma clínica apresentada (cardíaca ou digestiva) (DEGHAIDE; DANTAS; DONADI, 1998). As frequências do haplótipo DRB1*01 DQB1*0501 do alelo DPB1*0401 estavam significativamente aumentadas nos pacientes com cardiopatia, enquanto a frequência de DPB1*0101 foi maior entre os assintomáticos do que entre o grupo com insuficiência cardíaca congestiva (COLORADO et al., 2000). Nesse mesmo aspecto, Cruz-Robes et al. (2004) sugerem que os alelos do HLA podem estar associados com o desenvolvimento da infecção crônica e com o dano cardíaco na doença de Chagas. No entanto, os dados obtidos por Faé et al. (2000) indicam que os polimorfismos nas moléculas HLA-DR e DQ não influenciam a suscetibilidade às diferentes formas clínicas da doença de Chagas nem a progressão à cardiopatia. Esses estudos falham em apontar genes relevantes que causem a dicotomia clínica observada. Isso pode ser devido à heterogeneidade genética das populações estudadas (BILATE; CUNHA-NETO, 2008). Vários estudos têm indicado diferentes marcadores de suscetibilidade genética em pacientes com CCC.

Polimorfismos em citocinas têm sido estudados a fim de se obter uma associação com o desenvolvimento da infecção e/ou com a progressão para a CCC. A frequência do genótipo alto produtor de TGF- β 1 10C/C foi maior no grupo de pacientes nas populações peruana e colombiana comparada ao grupo controle, indicando suscetibilidade diferencial à infecção por *T. cruzi* (CALZADA et al., 2009).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Estudos em diferentes populações têm sido conduzidos para avaliar a associação de polimorfismos no gene do TNF- α . Foi relatada a associação entre polimorfismos no promotor do gene do TNF- α (alelo TNF-308A) e a suscetibilidade à cardiopatia na população mexicana (RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2005). Um estudo longitudinal conduzido por outro grupo mostrou que pacientes com CCC portadores do alelo TNF2 ou TNFa2 apresentaram menor tempo de sobrevivência quando comparados a portadores de outros alelos (DRIGO et al., 2006). Entretanto, dados de outro trabalho não mostraram diferenças significativas entre pacientes com CCC e indeterminados, ou entre CCC de acordo com a gravidade da cardiopatia em relação aos polimorfismos no promotor de TNF- α , posição -308 e TNFa (DRIGO et al., 2007). Semelhante falta de associação foi observada na população peruana para a posição -238 do gene do TNF- α (BERAÚN et al., 1998). Microssatélites no gene do TNF foram associados com a doença de Chagas; 8 conferindo suscetibilidade (TNFa2, TNFa7, TNFa8, TNFb2, TNFb4, TNFd5, TNFd7 e TNFe2) e 2 conferindo proteção (TNFb7 e TNFd3) contra o desenvolvimento da doença em pacientes considerados como um todo ou estratificados de acordo com as manifestações clínicas da doença (CAMPELO et al., 2007).

O haplótipo LTA+80A/+252A foi associado com a proteção contra CCC, enquanto o haplótipo LTA+80C/+252G parece conferir suscetibilidade a CCC (RAMASAWMY et al., 2007).

Foi possível demonstrar associação de polimorfismos no “cluster” de genes da IL-1 (FLÓREZ et al., 2006) e da região 3’ não traduzida (3’UTR) do gene da IL-12B (ZAFRA et al., 2007) e a suscetibilidade ao desenvolvimento de CCC.

Genes da imunidade inata são atraentes candidatos para se estudar a diferença de suscetibilidade para o desenvolvimento da CCC, uma vez que o parasitismo durante a fase aguda da infecção é controlado pela resposta imune inata (BILATE; CUNHA-

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

NETO, 2008). Variantes de BAT1, um gene anti-inflamatório associado com a regulação negativa de TNF- α e IL-6, podem ser menos eficientes em conduzir essa regulação negativa, contribuindo para uma produção elevada de citocinas inflamatórias em pacientes com CCC (RAMANAWMY et al., 2006). Todavia, polimorfismos em TLR2 Arg753Gln e TLR4 Asp299Gly e Thr399Ile (ZAFRA et al., 2008) e em variantes de NRAMP1 (5'(GT)_n, -236 C>T, D543N e deleção em 3'UTR) (CALZADA et al., 2001) não apresentaram papel importante na doença de Chagas, comparando-se soropositivos com soronegativos e assintomáticos com cardíacos. Outro gene associado é *IKBL*, um inibidor do fator de transcrição NF κ B que tem papel na imunidade inata. A probabilidade de desenvolver CCC é três vezes maior e duas vezes maior entre os indivíduos infectados portadores dos genótipos IKBL -62 AA e AT, respectivamente do que entre indivíduos homocigotos TT infectados por *T. cruzi* (RAMAWMY et al., 2008).

Variantes da quimiocina MCP-1 (CCL2), correlacionados com baixos níveis transcricionais, comportam-se como modificadores genéticos do resultado clínico da infecção por *T. cruzi*, e indivíduos com o genótipo CCL2 -2518AA têm quatro vezes mais risco de desenvolver CCC do que aqueles sem esse genótipo (RAMASAWMY et al., 2006). Polimorfismos no promotor do gene do CCR5, posição -59029, podem estar envolvidos na suscetibilidade à CCC (CALZADA et al., 2001). Porém, estudo realizado não observou diferença na distribuição do polimorfismo por deleção em delta 32 do CCR5 entre pacientes com cardiopatia e assintomáticos (FERNÁNDEZ-MESTRE; MONTAGNANI; LAYRISSE, 2004).

Polimorfismos nos genes do complemento também foram avaliados. Foi demonstrado que o alelo C3F é um marcador de suscetibilidade para a progressão para a forma cardíaca. Por outro lado, o alelo BF.S pode apresentar papel protetor contra a

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

forma cardíaca grave (MESSIAS-REASON; URBANETZ; PEREIRA DA CUNHA, 2003).

Não foi evidenciado papel para o polimorfismo no promotor do gene da óxido nítrico induzível (NOS2), (CCTTT)_n, na patogênese da infecção por *T. cruzi* na amostra do Peru (CALZADA et al., 2002).

Como pôde ser observado, diferentes genes têm sido pesquisados na tentativa de se encontrar associação entre um alelo e/ou um genótipo e a presença de CCC. É possível que a CCC seja uma doença complexa e como tal, além dos fatores ambientais, muitos genes podem conferir suscetibilidade ao indivíduo infectado por *T. cruzi* desenvolver a forma cardíaca da doença.

1.4. Papel Biológico da Linfotoxina Alfa (LT- α) e seus Polimorfismos Genéticos

A linfotoxina alfa (LT- α), também conhecida como Fator de Necrose Tumoral Beta (TNF- β), foi primeiramente caracterizada como um fator biológico, que em linfócitos estimulados por mitógenos, apresentava atividade anticelular em linhagens de células neoplásicas (GRANGER; WILLIAMS, 1968; BROWNING; RIBOLINI, 1989). Esse efeito foi confirmado posteriormente em estudo com linfotoxina natural e recombinante, mostrando sua ação necrótica em sarcomas MethA *in vivo* (GRAY et al., 1984). A linfotoxina tem peso molecular de aproximadamente 60000Da, e, se dissociada, de 20000Da após corrida em SDS-PAGE e ponto isoelétrico de 5,8 (AGGARWAL; MOFFAT; HARKINS, 1984).

LT- α é secretada por linfócitos T ativados, linfócitos B e células *Natural Killer* (NK) (WARE et al., 1995), embora tenha sido descrita expressão em melanócitos (MELANI et al., 1993), o primeiro caso de expressão não linfóide. Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ podem expressar LT- α de superfície (WARE et al., 1995). Em tecidos adultos, a

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

expressão de LT- α e LT- β ocorre exclusivamente em linfócitos do sangue periférico, baço e timo em humanos (WARE et al., 1995).

As linfotoxinas são parte de um complexo sistema de comunicação, ligando linfócitos, parênquima e células estromais que podem agir localmente ou em locais distantes. Duas formas estruturalmente distintas de LT são conhecidas, LT- α e LT- β , com localizações diferentes (secretada e restrita à membrana, respectivamente). Sozinhas ou combinadas, LT- α e LT- β formam moléculas triméricas que se ligam a receptores celulares distintos e desencadeiam respostas celulares diferentes (WARE, 2005).

LT- α e LT- β formam três ligantes distintos. LT- α pode existir como um homotrímero (LT- α_3) que é exclusivamente secretado devido à clivagem de seu sinal peptídico. Liga-se, assim como o TNF, em dois receptores TNFR1 e TNFR2. Dois heterotrimeros ancorados à membrana podem ser formados por LT- β e LT- α durante a biossíntese: LT- $\alpha_1\beta_2$ (forma predominante) e LT- $\alpha_2\beta_1$. A subunidade LT- β no heterotrímero LT- $\alpha_1\beta_2$ altera a especificidade de ligação ao receptor para se ligar com alta afinidade ao receptor de LT- β (LT- β R). Embora LT- $\alpha_2\beta_1$ se ligue a TNFR1 e TNFR2 e LT- β R (com baixa afinidade), é a forma menos expressa por células T, não tendo papel definido (WARE, 2005).

A LT- α e o TNF são membros da superfamília TNF e foram considerados formas redundantes. A estrutura similar, a íntima ligação e o arranjo em *tandem* dos genes do TNF reforçam o fato de que eles são funcionalmente relacionados e provavelmente evoluíram após a duplicação de um ancestral comum (NEDOSPASOV et al., 1986). Essa família de ligantes e de receptores correspondentes é definida por um domínio rico em cisteína que controla as vias de sinalização que iniciam a morte celular, sobrevivência e a diferenciação celular (WARE, 2005).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Apesar das atividades biológicas semelhantes de LT- α e TNF- α , essas citocinas são derivadas de tipos celulares diferentes e apresentam cinéticas distintas. LT- α é secretada por linfócitos T de 24 a 48 horas após a sua indução, enquanto que o TNF- α é secretado por monócitos 4 a 24 horas após a indução (NEDWIN et al., 1985). Embora LT- α e TNF- α apresentem apenas 30% de homologia e dividam os mesmos receptores, são codificadas por genes adjacentes, separados por cerca de 1kb e com regulação da transcrição distinta (VASSALLI, 1992). A meia vida do mRNA do TNF- α é curta (aproximadamente de 15 a 20 minutos). Ao contrário, o mRNA da LT- α é mais estável, com meia vida de 80 a 100 minutos (MILLET; RUDDLE, 1994).

Ainda assim, LT- α e TNF- α foram considerados formas redundantes. Entretanto, como um complexo com LT- β , LT- α aparece no sistema imunológico com funções distintas das de TNF- α , confirmadas em níveis moleculares e celulares. Em alguns processos fisiológicos, TNF- α e LT $\alpha\beta$ trabalham juntos como componentes de uma via de sinalização integrada. Essa sinalização integrada é definida em parte pelo compartilhamento de receptores e ligantes (LT- α , LT- β , TNF- α , LIGHT). A comunicação LT/TNF é conectada por quimiocinas específicas, interferons e outros ligantes da família TNF em um grande trabalho em rede (WARE, 2005).

Sobre a redundância de funções de LT- α e TNF- α , alguns trabalhos apontam para funções semelhantes, enquanto outros apontam papéis distintos para essas citocinas. Um trabalho demonstrou que camundongos deficientes em TNF e LT apresentaram defeitos mais graves na arquitetura do baço do que aqueles deficientes apenas em TNF ou LT, sugerindo que a redundância nas funções das duas citocinas existe, mas é pequena (KUPRASH et al., 2002).

Outro estudo mostrou que LT- α divide com TNF ações diretas em células endoteliais, causando aumento da expressão de receptores nessas células por várias estruturas de reconhecimento de leucócitos (antígeno reconhecido por H4/18, ICAM-1, HLA-A, B). A alteração da superfície endotelial causada por LT- α pode servir para facilitar a adesão de leucócitos e linfócitos no local da imunidade mediada por célula. Além disso, assim como TNF, LT- α provoca a reorganização de células endoteliais humanas, uma alteração que facilitaria o tráfego endotelial de linfócitos e leucócitos. Essas alterações induzidas por LT- α serviriam para amplificar a resposta imune mediada por células por aumentar a adesão local de linfócitos e outros leucócitos à superfície de células endoteliais e facilitar a migração (POBER et al., 1987). TNF e LT teriam importância na ativação de células endoteliais *in vivo*, levando ao desenvolvimento de células endoteliais altas e aumento da migração de linfócitos (CAVENDER; EDELBAUM; ZIFF, 1989). Foram evidenciados aumentos na atividade fagocítica e citotóxica de polimorfonucleares após o estímulo com LT- α e TNF- α (SHALABY et al., 1985). Ainda, LT e TNF induzem a expressão de CHP (Complexo de Histocompatibilidade Principal) classe I em células II-23.D7, o que está associado com a divisão de um mesmo receptor. Essas citocinas agiram como agonistas na indução de CHP classe I (ANDREWS; BERGER; WARE, 1990).

A produção de células dendríticas em culturas de medula óssea foi significativamente reduzida em camundongos deficientes em TNF (TNF^{-/-}) e em seu receptor (TNFR p55^{-/-}), mas normal em camundongos LT- α ^{-/-}, LT- β ^{-/-}, LT- β R^{-/-}. Os resultados mostraram dois papéis distintos para as citocinas TNF/LT. Primeiro, TNF, agindo através de seu receptor, está envolvido no desenvolvimento e maturação de células dendríticas. Segundo, o microambiente em órgãos linfóides periféricos associados com a sinalização LT- α /LT- β -LT β R é crucial para o recrutamento eficiente de células dendríticas e esta via é indispensável (ABE et al., 2003).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Para comparar a função dos sistemas TNF- α e linfotoxinas α/β no sistema imune maduro, essas duas vias foram bloqueadas com proteínas fundidas ao receptor de imunoglobulinas em camundongos adultos normais. A via LT α/β de camundongos adultos teria papel dominante na manutenção da arquitetura esplênica e em alguns aspectos da formação de imunoglobulina, enquanto que o papel do TNF- α parece estar centrado no desenvolvimento ou eventos hematopoiéticos. A inibição de LT α/β evitou a formação de centros germinativos no baço e prejudicou a produção de imunoglobulinas em resposta à imunização com células vermelhas de sangue de carneiro (SRBC). Esses resultados mostraram que o sistema LT α/β é necessário para a manutenção da arquitetura esplênica e das respostas imunes normais, e não simplesmente para o desenvolvimento de órgãos imunes periféricos durante a ontogenia (MACKAY et al., 1997).

Em relação aos papéis biológicos da LT- α , um estudo demonstrou que camundongos deficientes em linfotoxina (LT $^{-/-}$) apresentaram desenvolvimento anormal de órgãos linfóides periféricos, não tendo sido observados linfonodos poplíteos, inguinais, para-aórticos, mesentéricos, axilares ou cervicais, mesmo na presença de níveis normais de TNF- α (DE TOGNI et al., 1994; FU; CHAPLIN, 1999). Além disso, a expressão de LT- α favorece a maturação estrutural dos folículos do baço, incluindo o desenvolvimento e manutenção das células foliculares dendríticas, que propicia a mudança de classe de imunoglobulina e uma resposta efetiva de IgG (FU et al., 1997; FU; CHAPLIN, 1999).

Outro estudo demonstrou que células B expressando LT- α são essenciais para a recuperação das respostas imunes primária, secundária e de memória em camundongos *Knockout* para LT- α . Não é necessário que células T expressem LT- α para fornecer essas funções imunológicas. Células B expressando tal citocina sozinhas são essenciais e suficientes para a formação de aglomerados de células foliculares dendríticas. Uma vez que esses aglomerados são formados por células B expressando LT- α , então células T

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

deficientes em LT- α poderiam interagir com células B para gerar centros germinativos e produzir a mudança de classe dos anticorpos. As próprias células B forneceriam um sinal fundamental que induziria e manteria o microambiente linfóide, essencial para a formação e mudança de classe da resposta de imunoglobulinas (FU et al., 1998).

A fim de elucidar os mecanismos envolvidos na inflamação e desenvolvimento de órgãos linfóides desencadeados pela secreção de LT- α , as atividades biológicas de LT- α murina recombinante (mLT α) foram avaliadas. A preparação dessa citocina foi efetiva na indução da citotoxicidade em células de fibrossarcoma. Linfotóxina- α murina induziu a expressão de mediadores inflamatórios na linhagem de células endoteliais murinas bEnd.3, de moléculas de adesão VCAM, ICAM, E-selectina e molécula de adesão celular adesina de mucosa (MAdCAM-1). Quando mLT- α , LT- α humana e mTNF- α foram comparados, mLT- α foi o mais potente indutor de MAdCAM-1. Nenhuma dessas citocinas induziu a adesina de nódulos periféricos, PNAd. Linfotóxina- α murina induziu também a expressão das quimiocinas RANTES, proteína induzida por IFN 10 (IP-10) e proteína quimioatraente de monócito 1 (MCP-1). A partir dos dados obtidos, foi possível demonstrar que os efeitos pró-inflamatórios de LT- α 3 podem ser mediados, em parte, por meio da indução de moléculas de adesão e expressão de quimiocinas. Além disso, LT- α 3 pode promover o desenvolvimento do tecido linfóide por meio da indução de quimiocinas e adesina de mucosa MAdCAM-1 (KRATZ et al., 1996; CUFF et al., 1998; CUFF; SACCA; RUDDLE, 1999). Células do infiltrado crônico induzido em RIP-LT (*rat insulin promoter-LT*) mostraram atributos funcionais de um órgão linfóide em sua capacidade de gerar resposta de anticorpo dependente de células T e induzir a mudança de classe de imunoglobulinas (KRATZ et al., 1996). Ainda, foi mostrado que a linfotóxina- $\alpha\beta$ é necessária para a indução de adesina de nódulos periféricos que pode contribuir para o recrutamento de L-

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

os mecanismos potenciais pelos quais LT- α e LT $\alpha\beta$ podem, diferencialmente, promover o desenvolvimento de linfonodos mesentéricos e periféricos (CUFF; SACCA; RUDDLE, 1999).

No entanto, um estudo realizado com camundongos deficientes em LT- α , mas que produzem níveis sistêmicos normais de TNF, indicou que LT- α tem um papel menor na manutenção de órgãos linfóides do que se acreditava anteriormente e não tem função direta na expressão de TNF (LIEPINSH et al., 2006).

Foi demonstrado que LT- α 3 é importante para o recrutamento local de células linfóides e apresentadoras de antígenos e orchestra a neogênese durante a resposta imune por meio da regulação de moléculas de adesão e quimiocinas, normalmente encontradas em órgãos linfóides secundários (HJELMSTRÖM et al., 2000).

LT- α , mas não LT- β , é um ligante de Troy. A sinalização LT- α -Troy ativa a transcrição mediada por NF κ B. Essa sinalização está envolvida na interação mesênquima-epitélio durante o desenvolvimento dos anexos da pele (HASHIMOTO; SCHLESSINGER; CUI, 2008).

Foi demonstrado que a expressão de LT- α derivada de células T ajuda a controlar o tamanho fisiológico do estroma do timo e acelera sua involução via TNFR1/LT- β R em condições patológicas e possivelmente também no envelhecimento normal (HEIKENWALDER et al., 2008).

LT- α 3 tem um papel importante na inflamação. Resultados de um trabalho mostraram que a inflamação induzida por LT- α é dependente de sua interação com TNFR1. Não há papel óbvio para TNFR2, uma vez que na sua ausência, a inflamação induzida por LT- α é quantitativamente e qualitativamente semelhante àquela vista no tipo selvagem. Entretanto, a ausência de LT- β resultou em aumento na proporção de células de

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

sinalização por TNFR1 e papel separado e distinto para $LT\alpha 1\beta 2$ no processo inflamatório (SACCA et al., 1998).

A importância da $LT-\alpha$ foi avaliada em muitas doenças. Em relação à infecção por vírus, mostrou-se papel de $LT-\alpha$, em sinergia com $IFN-\gamma$, na inibição de vírus RNA e DNA em diferentes tipos celulares (WONG; GOEDDEL, 1986).

Na miastenia grave autoimune foi observada uma completa prevenção dessa doença em camundongos deficientes em $LT-\alpha$ ($LT-\alpha^{-/-}$) comparados com $LT-\alpha^{+/+}$, quando imunizados com receptor de acetilcolina. Camundongos $LT-\alpha^{-/-}$ tiveram títulos menores de IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b e maiores ou iguais títulos de IgM anti receptores de acetilcolina comparados com controles, sugerindo papel da $LT-\alpha$ na patogênese da miastenia grave (GOLUSZKO et al., 2001).

A $LT-\alpha$ liga-se à galectina-2, um membro da família lectina ligante de galactose. Um estudo caso-controle na população japonesa mostrou que polimorfismos em LGALS2 codificando galectina-2 estavam associados ao infarto do miocárdio. Essa alteração genética afeta os níveis de transcrição de galectina-2 *in vitro*, levando a uma secreção alterada de $LT-\alpha$, que afetaria o grau de inflamação. Os resultados apontam para uma ligação entre a cascata de $LT-\alpha$ e a patogênese do infarto do miocárdio (OZAKI et al., 2004).

$LT-\alpha 3$ é essencial no controle da tuberculose pulmonar. Sua função crítica não está na ativação de células T e macrófagos, mas na organização local da resposta granulomatosa (ROACH et al., 2001).

Camundongos deficientes em $LT-\alpha$ foram completamente resistentes à malária cerebral e morreram onze e quatorze dias após a infecção com anemia grave e hiperparasitemia. Os dados indicam que $LT-\alpha$ produzida por células resistentes à radiação

é o fator principal para o desenvolvimento da malária cerebral murina (ENGWERDA et al., 2002).

Os papéis do TNF- α e da LT- α foram estudados na infecção experimental por *Plasmodium chabaudi AS*. TNF- α e LT- α não foram necessários para a resolução da infecção sanguínea por *Plasmodium chabaudi AS*. Entretanto, LT- α , mas não TNF- α , foi necessária para a produção precoce de IFN- γ e a regulação da produção de IFN- γ em estágios posteriores da infecção. Camundongos deficientes em LT- α apresentaram atraso na produção de TNF, comparados com camundongos controle. Esses resultados identificaram papéis divergentes para TNF- α e LT- α na regulação da resposta imune do hospedeiro durante a infecção por *Plasmodium chabaudi AS* (CLARK et al., 2007).

Os dados de outro trabalho indicaram que TNF- α e LT- α são importantes para a resistência do hospedeiro à *L. donovani* no fígado nos primeiros 14 dias de infecção. Em períodos posteriores da infecção, TNF, mas não LT- α , é crítico para a sobrevivência do hospedeiro. As produções de TNF- α e LT- α por taxa de células resistentes foram necessárias para a formação eficiente de granuloma, embora cada citocina seja necessária em diferentes estágios do recrutamento de leucócitos. TNF- α e LT- α , produzidos por linfócitos T CD4⁺, não têm papéis redundantes na resistência e sobrevivência do hospedeiro (ENGWERDA et al., 2004).

LT- α tem papel importante no controle da infecção experimental por *Toxoplasma gondii* no sistema nervoso central e na sobrevivência do hospedeiro. Comparados com camundongos controle, os deficientes em TNF e/ou LT- α mostraram redução na sintase do óxido nítrico induzida (iNOS), falha em controlar *T. gondii* no cérebro e prejuízo da atividade antitoxoplasma de macrófagos (SCHLÜTER et al., 2003).

Na infecção experimental por *Trypanosoma brucei*, foi observado que, ao contrário

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

que camundongos deficientes em LT- α apresentaram título séricos aumentados de IgM-IgG2a, coincidindo com uma melhora no estágio final de controle da parasitemia, enquanto apresentaram significativa deficiência na respostas IgG1, IgG2b e IgG3 (MAGEZ et al., 2002).

Em relação à doença de Chagas experimental, há na literatura apenas um trabalho demonstrando o papel da LT- α nessa doença. Foi sugerido que os linfócitos podem ser capazes de controlar a proliferação de *T. cruzi* diretamente via linfotóxina. Os resultados mostraram que camundongos, infectados com a cepa CL, C3H/HeL e A/J diferiram significativamente de C57BL/6 na capacidade de secretar LT- α *in vitro* em resposta à ativação policlonal de fitohemaglutinina (PHA). Camundongos C57BL/6 secretaram de 2 a 17 vezes mais LT do que C3H/HeJ. Esse trabalho foi o primeiro relato da ação direta de sobrenadantes contendo linfotóxina sobre as formas tripomastigotas. Os autores discutiram que a alta secreção de LT- α em animais infectados poderia representar uma resposta natural à infecção ou poderia, simplesmente, indicar a ativação de linfócitos do hospedeiro (KRASSNER et al., 1982).

Tratando-se da genética da LT- α , o *locus* do TNF está localizado dentro da região central do Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP) classe III, no cromossomo 6. Os genes do TNF e da LT- α têm cerca de 3kb pares de base e estão separados por, aproximadamente, 1100 pares de base (MAKHATADZE, 1998).

Estudos do polimorfismo nos genes humanos de TNF revelaram a existência de quatro alelos para o gene da LT- α detectados por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) com a utilização de *NcoI* e *EcoRI*. Os alelos do TNF estão em forte desequilíbrio de ligação com os alelos do HLA I e II, sendo possível que defeitos estruturais ou regulatórios nos genes do TNF contribuam para a patogênese de doenças associadas ao HLA (MAKHATADZE, 1998).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Foi possível localizar um sítio de restrição polimórfico de *NcoI* dentro do primeiro íntron do gene da LT- α . A substituição do nucleotídeo A por G, na posição +252 do gene da LT- α cria um sítio de restrição para a enzima *NcoI* (MESSER et al., 1991). Utilizando-se ensaios de PCR-RFLP, é possível obter dois alelos. Um, contendo o sítio de restrição da enzima, e conhecido como LT- α (5.5kb) e outro, que não possui o sítio de restrição, chamando de LT- α (10.5kb). O alelo LT- α (5.5kb) corresponde à presença do nucleotídeo G e após análise por PCR-RFLP, podem ser observadas duas bandas de 133 e 235bp. LT- α (10.5kb) corresponde à presença do nucleotídeo A e apresenta apenas uma banda de 368bp (WARZOCHA et al., 1998).

Avaliando-se se os mecanismos regulatórios eram afetados pela presença desse polimorfismo, observou-se que a presença alelo LT- α (5.5kb) implicava em maior produção de LT- α , após estímulo por PHA (MESSER et al., 1991; OZAKI et al., 2002). A análise de mRNA demonstrou que maiores níveis da produção de LT- α se correlacionavam com quantidades aumentadas do transcrito. Nenhuma associação foi encontrada em relação à produção de TNF- α . Esse polimorfismo, conservado em humanos e camundongos, está localizado dentro de um elemento forbol-éster responsivo a DNA (TRE) com alta afinidade para AP-1, jun e c-fos (família de fatores de transcrição). Esse foi o primeiro trabalho mostrando o polimorfismo no primeiro íntron do gene da LT- α , posição +252 e seu provável aspecto funcional (MESSER et al., 1991). A partir daí, vários trabalhos têm sido desenvolvidos para se buscar uma associação entre e o polimorfismo descrito acima.

Em doenças não infecciosas de diferentes etiologias, foi observada associação entre a presença do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252, e a piora da função pulmonar em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (RUSE et al., 2007), câncer

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

al., 2002), perdas gestacionais recorrentes (ZAMMITTI et al., 2008), esquizofrenia (JUN et al., 2003), artrite psoriática (BALDING et al., 2003), lúpus eritematoso sistêmico sem (TAKEUCHI et al., 2005) e com nefrite (KIM et al., 1996). Entretanto, outros autores não observaram tal associação, como, por exemplo, na leucemia linfoblástica aguda (STANULLA et al., 2001), síndrome respiratória aguda (GONG et al., 2005), linfoma não-Hodgkin (WARZOCHA et al., 1998), asma atópica (WANG et al., 2004) e doença intestinal inflamatória (SONG et al., 2005).

Pela importância da LT- α na patogênese do infarto do miocárdio, esse polimorfismo foi estudado, observando-se associação em alguns estudos (OZAKI et al., 2002; MIZUNO et al., 2006), enquanto não em outros (KESO et al., 2001; KOCH et al., 2001).

Em doenças infecciosas, existem alguns trabalhos mostrando associação entre o genótipo TNF- β A/A e hepatite C (GOYAL et al., 2004) e hepatite B (SUNEETHA et al., 2006). Todavia, em leishmaniose visceral do mediterrâneo não foi possível verificar qualquer associação (MEDDED-GARNAOUI et al., 2001).

Em doença de Chagas, há apenas um trabalho mostrando que o haplótipo LTA+80A/+252A estava associado com a proteção contra CCC, enquanto o haplótipo LTA+80C/+252G estava associado com a suscetibilidade (RAMASAWMY et al., 2007). Portanto, fazem-se necessários mais estudos que esclarecem o papel deste polimorfismo no desenvolvimento da CCC e/ou na suscetibilidade à infecção por *T. cruzi*.

Assim, a hipótese desse trabalho é que polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias podem contribuir para a patogênese da cardiopatia chagásica crônica e esclareceriam a razão de alguns indivíduos soropositivos permanecerem assintomáticos, enquanto outros progridem para a CCC. Para isso, foi estudado o polimorfismo no primeiro íntron do gene da LT- α , posição +252, cuja presença do alelo G está associada a

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

uma maior produção da citocina. Foi proposto que os indivíduos portadores do alelo G teriam uma suscetibilidade aumentada para o desenvolvimento da CCC.

1.5. Justificativa

O papel da linfotóxina alfa tem sido pouco estudado atualmente, apesar de sua importância em fenômenos inflamatórios, semelhantes àqueles observados na doença de Chagas. A identificação das células produtoras e de seu subtipo necessita de mais esclarecimentos.

Além disso, diferenças na produção dessa citocina, entre indivíduos de uma mesma população, ocasionadas pela presença de polimorfismos, podem ajudar a explicar a progressão para a forma cardíaca em 30% dos indivíduos infectados, enquanto o restante permanece assintomático.

É possível, portanto, que polimorfismos em genes de citocinas inflamatórias, como a LT- α , expliquem as diferenças de produção da citocina, bem como a progressão para a forma cardíaca da doença.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

1.6. Objetivos

- ❖ Identificar a frequência do polimorfismo na posição +252 no gene da linfotoxina alfa em indivíduos com sorologia positiva e negativa para *T. cruzi* e em pacientes com as formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica;
- ❖ Comparar as frequências dos genótipos do polimorfismo na posição +252 no gene da linfotoxina alfa em pacientes com as formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica com indivíduos do grupo controle de uma mesma área endêmica;
- ❖ Associar a presença do alelo polimórfico com a presença de infecção por *T. cruzi* e a forma clínica desenvolvida pelo indivíduo;
- ❖ Comparar os níveis de LT- α produzidos por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com os diferentes genótipos do polimorfismo na posição +252 no gene da linfotoxina alfa, com indivíduos do grupo controle de uma mesma área endêmica;
- ❖ Avaliar o subtipo de linfócito T (CD4⁺ ou CD8⁺) produtor de LT- α por meio de citometria de fluxo.

2.1. Amostra de Estudo

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFTM, sob protocolo número 920.

Foram incluídos neste estudo 485 indivíduos. Os indivíduos foram provenientes dos municípios de Água Comprida e Uberaba, acompanhados por profissionais da área de saúde dos respectivos municípios e no Ambulatório de doença de Chagas do Hospital de Clínicas da UFTM, com idade média de 50,2 anos (desvio padrão de 14,462) Todos receberam esclarecimentos a respeito da pesquisa e, após assinatura de termo de consentimento, foram submetidos à coleta de amostra de sangue periférico para a realização dos experimentos. Foram coletadas duas amostras de 10mL a 20mL cada uma por meio de punção venosa periférica com agulhas e tubos de coleta a vácuo (BD VACUNTAINER™), contendo heparina sódica como anticoagulante. A coleta foi realizada na Unidade de Saúde de Água Comprida e no Laboratório de Imunologia da UFTM, com a colaboração de funcionários do local. Foram realizados pelo menos dois testes sorológicos (ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* e hemaglutinação) para confirmação da sorologia para *Trypanosoma cruzi*.

Nesse estudo, foram incluídos apenas os indivíduos com idade igual ou superior a 25 anos em 2000 (início do estudo), por se tratar do indivíduo soropositivo mais jovem. Nessa área, a transmissão vetorial da doença foi controlada na década de 80, razão pela qual não se encontra soropositividade abaixo dos 25 anos. Ainda, o tempo decorrido da infecção até os dias atuais seria suficiente para as possíveis manifestações da fase crônica. Foram excluídos os indivíduos infectados pelo HIV.

Os indivíduos com sorologia positiva realizaram exames complementares de eletrocardiograma, raio X de tórax, esofagograma, raio X contrastado de intestino e ecocardiograma e foram classificados nas formas clínicas da doença de Chagas crônica, de

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

acordo com os critérios estabelecidos na *I Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas*, em 1985. As formas clínicas digestiva e mista foram utilizadas apenas nas análises da sorologia.

2.2. Meio RPMI (*Instituto Roswell Park Memorial*)

Este meio foi preparado com 10,39g de RPMI-1640 (BRL, NY, USA) acrescido de 2,0g de bicarbonato de sódio, 2,38g de Hepes (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) e 40 mg de gentamicina. Estes reagentes foram completados com um volume de 1000 mL de água ultrapura, mantendo-se em agitação constante em agitador magnético. O meio foi filtrado em membrana estéril de 0,22 μ m (Millipore, St. Louis, USA). O teste de esterilidade foi feito com uma amostra do meio por 24 horas a 37°C. Esse meio, acrescido de 5% de FCS (Soro Fetal Bovino) (Gibco, Argentina) e 50mM de Hepes (Gibco), foi denominado meio completo e utilizado nos ensaios de produção de sobrenadantes para análise de citocinas.

2.3. Meio de Cultura Schneider's

Foi preparado a partir de 24,1g de Schneider's Insect Medium (Sigma) em 1000mL de água ultrapura. Este meio acrescido de 20% de FCS (Gibico), 2g de cloreto de magnésio e 40mg de gentamicina foi denominado meio completo. O meio foi filtrado em membrana estéril de 0,22 μ m (Millipore). O teste de esterilidade foi feito com uma amostra do meio por 24 horas a 37°C.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

2.4. Obtenção de Antígeno de *Trypanosoma cruzi*

Para a obtenção dos antígenos, a forma epimastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foi utilizada. O parasito foi cultivado em meio Schneider (Sigma-EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino e cultivado em estufa a 28°C. No final da fase logarítmica de crescimento, os parasitos foram colhidos e transferidos para um tubo cônico de 50mL. A suspensão parasitária foi lavada 3 vezes com RPMI e centrifugada a 1200xg por 15 minutos a 4°C. A massa de parasitos foi submetida a seis ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-Maria a 37°C. O material foi centrifugado a 1500xg, o sobrenadante filtrado em filtro de 0,22µm (Millipore EUA) e congelado a -70°C. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford por meio de conjunto de reagentes (kit) BCA (Pierce-EUA), conforme orientação do fabricante. A concentração protéica foi ajustada para 1mg/mL.

2.5. Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos indivíduos participantes do estudo foram separadas por densidade, por centrifugação em Ficoll-Hypaque™ plus (GE Healthcare). Os 10 a 20mL de sangue foram colocados sobre 12mL de Ficoll-Hypaque e centrifugados por 20 minutos, a 20°C e 400xg. A seguir, as células mononucleares, que formaram a interface, foram coletadas e transferidas para outro tubo. Foram, então, lavadas três vezes em meio RPMI incompleto (GIBCO – EUA), por centrifugação a 200xg, durante 15 minutos e a temperatura de 4°C. Finalmente, os PBMC foram ressuspensos em meio RPMI completo. A concentração de células foi ajustada para 2×10^6 células por mL, após contagem em câmara de Neubauer. Cada poço das placas de cultura de 24 poços (FALCON) recebeu 1mL de suspensão de células, que foi incubada por 48 horas e 120 horas em presença de: meio, antígeno de *T. cruzi* a 5µg/mL, e

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

fitohemaglutinina (PHA) (SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS – EUA) a 5µg/mL. Decorridos os períodos de 48 e 120 horas, os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer -70°C. O sedimento das culturas de 48 horas foi usado para avaliar a expressão intracelular de LT-α por citometria de fluxo.

2.6. Análise da Expressão de CD4, CD8 e LT-α por Citometria de Fluxo e Aquisição de Dados

Os anticorpos produzidos pela BD Pharmingen consistiram de anti-CD8 marcado com FITC, anti-CD4 marcado com PE-Cy5 e anti-LT-α marcado com PE. Isotipos controles foram utilizados apropriadamente. Todos os anticorpos foram manuseados de acordo com as instruções do fabricante. PBMC foram recuperados de cultura de células de 48 horas, na ausência de estímulos e presença de antígenos de *T. cruzi*. As células (concentração de 2×10^5 por tubo) foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon®, USA), próprios para citometria de fluxo. Em seguida, foram lavadas uma vez, em tampão gelado (PBS-Dubecco's 1% BSA) e centrifugadas a 400xg por 10 minutos a 20°C. Os sedimentos de células foram ressuspensos em 100µL de tampão PBS-BSA e colocados para reagir com os anticorpos anti-CD8 e anti-CD4. Após 30 minutos de incubação, no escuro e a 4°C, as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão e centrifugadas a 300xg por 5 minutos a 20°C. Foram, então, fixadas e permeabilizadas com Solução de Trabalho Fixação/Permeabilização (Pharmingen-USA) por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes com tampão PBS-1% BSA. Após a última lavagem, os sedimentos celulares foram ressuspensos em 100µL de Tampão de Permeabilização 1X e foi acrescentado o anticorpo anti-LT-α. Houve uma incubação no escuro a 4°C, por 30 minutos. Novamente, as células foram lavadas por duas vezes em Tampão de

Permeabilização 1X e ressuspendidas em paraformaldeído 1% diluído em PBS Dulbecco's (Sigma).

Um total de 20000 eventos/tubo foram adquiridos utilizando-se o citômetro de fluxo FACScalibur® (BD). O programa de computador (*software*) *Cell quest TM* fornecido pelo fabricante foi utilizado para a aquisição e análise dos dados. Os “gates” foram estabelecidos de forma a permitir a avaliação das células mononucleares (FSC e SLC) e o número de linfócitos T CD4 e CD8 positivos para linfotóxina alfa.

2.7. Quantificação de LT- α por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

A LT- α presente nos sobrenadantes de cultura foi dosada por ELISA, utilizando-se pares de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis. Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, sensibilizadas com os anticorpos monoclonais específicos para a captura da LT- α a uma concentração de 1 μ g/mL (BD-Pharmingem-EUA). Após 18 horas, cada poço foi bloqueado pela adição de 200 μ L de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 2% de albumina bovina (Sigma) (PBS/BSA). Às fileiras 11 e 12 de cada placa foram adicionados 100 μ L de citocina padrão recombinante, sendo 1000pg/mL no primeiro poço, seguindo diluições seriadas 1:2 em PBS/BSA. Às outras fileiras foram adicionados 50 μ L/poço dos sobrenadantes, obtidos de culturas e igual volume de PBS-BSA. As placas foram incubadas a 4°C, por 16 horas e lavadas por 4 vezes com uma solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). A seguir, foram adicionados 70 μ L/poço do anticorpo anti-LT- α (BD-Pharmingem-EUA) marcado com biotina diluído em PBS-BSA. As placas foram incubadas novamente por 2 horas à 37°C e lavadas por 4 vezes em PBS-T. Após esta etapa, foram adicionados 100 μ L/poço de streptoavidina conjugada à peroxidase, diluída 1:2000 em PBS-BSA. As placas foram incubadas por 2

horas e lavadas por 4 vezes com PBS-T, quando, então, foram adicionados 100µL/poço de substrato contendo 1,2 ortofenilenodiamino (OPD).

Os resultados foram obtidos pela diferença entre as absorbâncias obtidas a 405 e 490nm ($Abs_{405} - Abs_{490}$), medidas em um leitor automático de ELISA (Biorad 2550 READER EIA). A concentração da citocina nos sobrenadantes foi estimada por análise de regressão com as absorbâncias obtidas em uma curva padrão da citocina recombinante, realizada simultaneamente e expressa em pg/mL. A sensibilidade do teste foi de 2pg/mL.

2.8. Genotipagem

O polimorfismo na posição +252 do gene da linfotoxina alfa foi analisado (MESSER et al., 1991). Foram genotipados 284 indivíduos, sendo 123 com sorologia positiva para *T. cruzi* (70 com a forma cardíaca e 53 com a forma indeterminada) e 161 com sorologia negativa.

2.8.1. Lise de Células

A lise de células foi realizada na massa de hemácias e leucócitos, restantes do fracionamento dos PBMC e também no sangue total, após a retirada do plasma, nas amostras que não foram submetidas à cultura celular.

O material foi transferido para um tubo cônico de 50mL. Houve uma centrifugação a 500xg, durante 10 minutos para a retirada do plasma. Então, o tampão de lise TE 20:5 (TRIS-EDTA), composto por Tris-HCl 1M e EDTA 0,5M, pH 8,0 foi acrescentado até completar o volume para 45mL. As amostras foram submetidas a uma agitação em vórtex para que as hemácias fossem lisadas mais facilmente. O passo seguinte foi a centrifugação a 1400xg, durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Ao final de cada centrifugação, o sobrenadante rico em lisado de hemácias foi desprezado e o volume foi completado

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

novamente para 45mL com o tampão TE 20:5. Os procedimentos foram repetidos até que se fosse obtido um sedimento de leucócitos o mais livre possível de hemácias. Esse sedimento foi transferido para um microtubo *Bio free* de 2mL (SARSTEDT), livre de enzimas, como DNAses e RNAses, que pudessem comprometer o DNA a ser extraído. Foi adicionado, ainda, 1mL de tampão TE 20:5 e as amostras foram centrifugadas a 10000xg. O sobrenadante foi desprezado e as amostras armazenadas a -20°C para posterior extração de DNA genômico.

2.8.2. Extração do DNA Genômico

Para obtenção de DNA de melhor qualidade, as amostras foram tratadas por duas técnicas diferentes. Caso ainda restassem hemácias no sedimento de leucócitos, a técnica de escolha seria o Método de Extração de DNA pelo Fenol-Clorofórmio. Se o sedimento estivesse bastante livre de hemácias, empregar-se-ia o Método de Extração pelo DNAzol.

Extração de DNA Genômico pelo Método do Fenol-Clorofórmio

Ao sedimento armazenado, foram adicionados 200µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 65µL de proteinase K (20µg/mL). As amostras foram incubadas por cerca de 18 horas a temperatura ambiente. No dia seguinte, foram adicionados 1900µL de acetato de sódio e a mistura foi homogeneizada por meio de inversão suave. O fenol-clorofórmio-álcool-isoamílico 25:24:1 (Sigma) foi acrescentado em um volume de 5mL. Houve a homogeneização em agitador orbital por 20 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 1000xg por 20 minutos a temperatura ambiente. O DNA solubilizado encontrava-se no sobrenadante (fase aquosa) e foi retirado com o auxílio de uma pipeta. Foi, então, transferido para um microtubo do tipo EPPENDORF de 2,0mL onde foi precipitado com etanol 100%. Houve novamente uma centrifugação a 4500xg por 10 minutos a temperatura

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

ambiente. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se por três vezes com etanol 70%. Em seguida, ressuspendeu-se em 300µL água ultra pura filtrada em filtro de 0,22µm e autoclavada. Para verificar se o DNA extraído possuía boa qualidade, uma eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada. Em seguida, as amostras foram estocadas em *freezer* a -20°C.

Extração de DNA pelo Método Dnazol

Ao sedimento de leucócitos estocado, acrescentou-se 1mL de *DNAzol Reagent* (GIBCO BRL) comercialmente disponível. Em seguida, centrifugou-se a 10000xg a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo do tipo EPPENDORF de 2mL e foi acrescentado etanol 100% no volume de 500µL. Os tubos foram homogeneizados por inversão e aguardou-se aproximadamente 1 a 3 minutos. Novamente, houve uma centrifugação a 10000xg a temperatura de 4°C, durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e utilizou-se uma solução de etanol 70% para a lavagem do material. O procedimento de centrifugação foi repetido até que se obtivesse uma amostra de DNA o mais límpida possível. O DNA foi ressuspendido em 500µl de água ultra pura filtrada em filtro de 0,22µm e autoclavada. Para verificar se o DNA extraído possuía boa qualidade, uma eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada. Em seguida, as amostras foram estocadas em *freezer* a -20°C.

2.8.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para um volume total de 50µl por reação foram utilizados:

- ❖ 38,80µL de água MILLI-Q estéril e filtrada em filtro de 0,22µm;
- ❖ 5,0µL de tampão 10X sem Cloreto de Magnésio (MgCl₂), concentração final de 1X (Invitrogen);
- ❖ 2,0µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) 50mM, concentração final de 2mM (Invitrogen);
- ❖ 1,0µL de dNTPs (10mM), concentração final de 0,2mM (GIBCO-BRL);
- ❖ 1,0µL de cada iniciador (*primer F* CTC CTG CAC CTG CCT GGA TC; *primer R* GAA GAG ACG TTC AGG TGG TGT CAT) (Invitrogen) (WARZOCHA et al., 1998);
- ❖ 0,20µL (500 unidades, 5U/µL) de Taq DNA polimerase *platinum*, concentração final de 0,02U/µL (Invitrogen);
- ❖ 1,0µL de DNA genômico.

As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 95° C, por 5 minutos, seguida por 35 ciclos. A **desnaturação** da dupla-hélice de DNA foi realizada à temperatura de 95°C, durante 1 minuto, seguida da **associação**, a uma temperatura de 58°C, por 1 minuto e, posteriormente, a **extensão** da cadeia realizada pela enzima taq DNA-polimerase a 72°C durante 1 minuto. As amostras foram submetidas a uma extensão final a 72°C durante 3 minutos, garantindo a extensão adequada da fita. A amplificação da sequência de DNA estudada foi realizada em um termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*.

2.8.4. Análise de Restrição

A enzima utilizada foi a *NcoI*. Esta enzima é isolada de *Rhodococcus sp.* e seu sítio de reconhecimento é 5' C[↓]CATG G 3' / 3' G GTAC[↓]C 5'.

Então, para um volume final de 12,1µL foram utilizados:

- ❖ 0,1µL de enzima *NcoI* (10U/µL) (BioLabs);
- ❖ 1,5µL de tampão REACT 3, fornecido com a enzima (BioLabs);
- ❖ 10,5µL de água MILLI-Q estéril e filtrada em filtro de 0,22µm;
- ❖ 3,0µL de produto de PCR, anteriormente realizada.

A reação de digestão foi realizada por 18 horas a 37°C, em estufa livre de CO₂.

2.8.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Para a obtenção dos resultados, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Cada placa de gel possui 10 poços, sendo que no primeiro foi colocado um marcador molecular de 50bp (1,0µL), seguido pelo controle negativo das PCRs (o DNA foi substituído por água devidamente esterelizada). Foram utilizados géis de poliacrilamida 10% para a visualização dos alelos na posição +252 (bandas de 368, 235, 133bp).

Se houver o polimorfismo, haverá o aparecimento do sítio de restrição da enzima pela substituição de A por G (criação de um sítio de restrição). Quando houver a clivagem, dois fragmentos serão formados, um de 235 e outro de 133 bp, correspondentes ao alelo LT-α 5.5kb (GG). Quando a clivagem não ocorrer, apenas um fragmento de 368bp será gerado (alelo LT-α 10.5kb, AA). A presença do alelo de 368bp foi registrada como AA (não digerido), dos alelos de 235 e 133bp como GG (digerido) e dos três alelos (368, 235 e 133bp) como AG (heterozigoto) (**figura 01**).

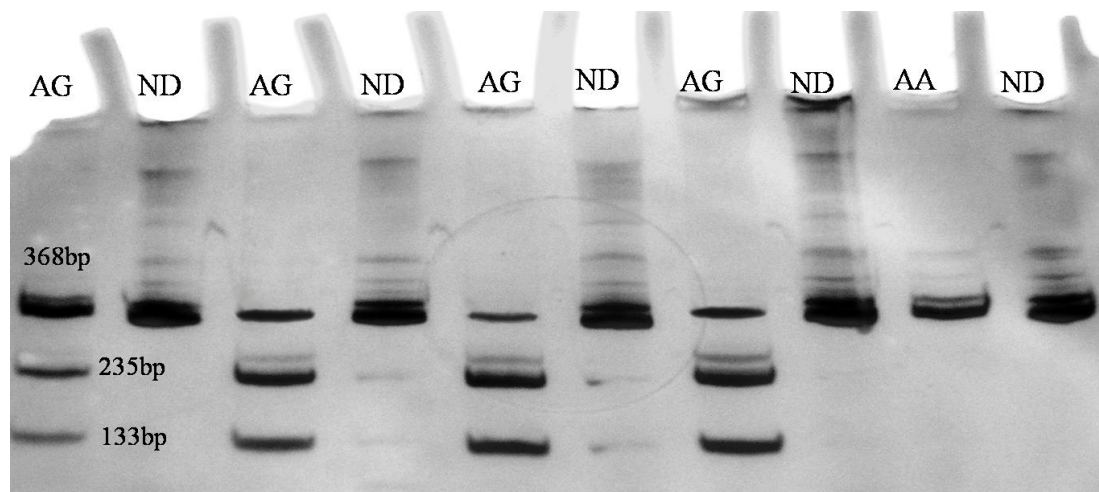


Figura 01 - Representação de eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, corado pela prata, exemplificando os genótipos AG (heterozigoto) e AA (homozigoto não digerido). ND representa o produto da PCR, usado como controle.

As eletroforeses foram realizadas em tampão TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). O tempo de corrida foi de aproximadamente duas horas, em uma voltagem de 100 volts. Terminada a eletroforese, os géis foram retirados das placas e colocados em uma solução composta por etanol absoluto (83,30mL), por ácido acético (3,33mL) e água ultra pura em quantidade suficiente para completar o volume de 500mL, durante 15 minutos. A solução foi desprezada e foi acrescentada uma solução de prata (1g de nitrato de prata 1% e água ultra pura em quantidade suficiente para completar o volume de 500mL), por 20 minutos. Antes da revelação, os géis foram lavados por 3 vezes em água. Acrescentou-se a solução reveladora (15g de NaOH, 3,33mL de formaldeído e água em quantidade suficiente para completar o volume de 500mL). Depois, os géis foram fotografados para arquivo.

2.9. Análise dos Dados

Para a análise estatística da frequência dos genótipos, foi utilizado o teste do Qui-quadrado, verificando a associação entre as variáveis estudadas. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). O teste foi realizado com o auxílio do programa de estatística *Statsoft Statistica – versão 8*. Para avaliação de *Odds Ratio (OR)*, com intervalo de confiança de 95%, foi utilizado o programa SPSS – versão 16.

Para a análise estatística da dosagem de LT- α foram aplicados testes não paramétricos, por apresentar distribuição não normal. Na comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, e na comparação entre três ou mais grupos, o teste de Kruskal-Wallis. O nível considerado de significância para os testes foi de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizados no programa estatístico *StatiView Abacus Concepts versão 4,57*. Para comparar dados do mesmo paciente, frente a diferentes tempos de observação, foi aplicado o teste de Wilcoxon.

Para a análise da porcentagem de células T CD4⁺ ou T CD8⁺ que expressaram LT- α foram utilizados testes paramétricos, devido à distribuição normal das variáveis. O teste utilizado foi o teste T pareado, quando as variáveis eram dependentes e o teste T não pareado quando as variáveis eram independentes, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), analisado no programa estatístico *StatiView Abacus Concepts versão 4,57*.

3.1. Descrição da Amostra

Nesse estudo, foram incluídos um total de 485 indivíduos, classificados de acordo com a sorologia positiva ou negativa para *T. cruzi*. Aqueles com sorologia positiva para *T. cruzi* foram classificados por forma clínica, segundo os critérios estabelecidos na *I Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas*, em 1985, foram analisados 221 indivíduos. Ao considerarmos os indivíduos com sorologia positiva (n=259), foram incluídos aqueles com as formas clínicas cardíaca, digestiva, indeterminada, mista da doença de Chagas crônica e aqueles não classificados clinicamente. Já na análise por forma clínica, foram considerados apenas indivíduos portadores das formas cardíaca (n=70) e indeterminada (n=53), em um total de 123 indivíduos.

A amostra foi composta por um total de 485 indivíduos, sendo 269 (55,40%) do gênero feminino e 216 (44,60%) do gênero masculino. Dos indivíduos do gênero feminino, 132 (27,20%) apresentaram sorologia positiva e 137 (28,20%) sorologia negativa. Dos indivíduos do gênero masculino, 127 (26,20%) apresentaram sorologia positiva e 89 (18,40%) sorologia negativa para *T. cruzi* (**tabela 01**).

Tabela 01 - Distribuição das frequências das sorologias positiva e negativa para *T. cruzi* em relação ao gênero dos indivíduos da amostra.

	Sorologia					
	Positiva		Negativa		Total	
Gênero	N	%	N	%	N	%
Feminino	132	27,20	137	28,20	269	55,40
Masculino	127	26,20	89	18,40	216	44,60
Total	259	53,40	226	46,60	485	100

Em relação à idade dos indivíduos da amostra, a média foi de 50 anos (desvio padrão de 14,465). Os indivíduos do gênero feminino e com sorologia positiva para *T. cruzi* apresentaram idade média de 56 anos (desvio padrão de 13,480) e os indivíduos do gênero masculino, idade média de 55 anos (desvio padrão de 12,186). A média de idade geral dos indivíduos com sorologia negativa foi de 43 anos (desvio padrão de 13,486). Dos indivíduos com sorologia negativa para *T. cruzi* (grupo controle), a idade média entre os gêneros feminino e masculino foi de 41 anos (desvio padrão de 13,207) e 47 anos (desvio padrão de 13,141), respectivamente. Entre os indivíduos com a forma cardíaca, a idade média foi de 58 anos (desvio padrão de 12,119), entre os indivíduos com a forma indeterminada 53 anos (desvio padrão de 12,575) e entre os indivíduos com a forma mista de 57 anos (desvio padrão de $\pm 15,049$).

Dos 259 indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi*, foi possível caracterizar clinicamente 221. Destes, 113 (51,13%) foram classificados clinicamente na forma cardíaca, 08 (3,62%) na digestiva, 79 (35,75%) na indeterminada e 21 (9,5%) na forma mista da doença de Chagas crônica. Classificados de acordo com gênero foram observados na forma cardíaca, 53 (46,90%) indivíduos do gênero feminino e 60 (53,10%) do gênero masculino, na forma digestiva 03 (37,50%) do gênero feminino e 05 (62,50%) do gênero masculino, na forma indeterminada 46 (58,20%) femininos e 33 (41,80%) masculinos e na forma mista, 16 (76,20%) femininos e 05 (23,80%) masculinos (**tabela 02**).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Tabela 02 - Distribuição das frequências das formas clínicas da doença de Chagas crônica, em relação aos gêneros feminino e masculino dos indivíduos da amostra.

Formas Clínicas										
	Cardíaca		Digestiva		Indeterminada		Mista		Total	
Gênero	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Feminino	53	46,90	03	37,50	46	58,20	16	76,20	118	53,40
Masculino	60	53,10	05	62,50	33	41,80	05	23,80	103	46,60
Total	113	100	08	100	79	100	21	100	221	100

3.2. Genotipagem

Um polimorfismo que afeta a expressão de LT- α foi encontrado no primeiro íntron do gene da LT- α , na posição +252 (MESSER et al., 1991). Essa variação genética resulta no aparecimento do sítio de restrição da enzima *NcoI*, pela substituição de A por G. A presença do nucleotídeo A impede a digestão pela enzima e gera banda de 368bp, com os *primers* utilizados nesse estudo. Quando o nucleotídeo G está presente, há o aparecimento de um sítio de restrição e são observadas duas bandas, de 235 e 133bp (WARZOCHA et al., 1998).

Foi possível obter o genótipo de 304 indivíduos, sendo 133 (43,75%) do gênero masculino e 171 (56,25%) do gênero feminino. Dos indivíduos que apresentaram o genótipo AA, 70 (46,67%) foram do gênero masculino e 80 (53,33%) do gênero feminino. Daqueles genotipados como AG, 54 (44,26%) eram homens e 68 (55,74%) mulheres. Dos indivíduos que apresentaram o genótipo GG, 09 (28,13%) foram do gênero masculino e 23 (71,88%) do gênero feminino (**tabela 03**). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos genótipos para o polimorfismo da LTA, posição +252, e o gênero dos indivíduos da amostra (X^2 ; $p= 0,156$). A frequência do alelo A foi de

72,90% no gênero masculino e 66,67% no gênero feminino. O alelo G teve frequência de 27,10% no gênero masculino e de 33,33% no gênero feminino.

Tabela 03- Distribuição das frequências dos genótipos AG, AA e GG para a posição +252 do gene da LT- α em relação ao gênero dos indivíduos da amostra.

	Genótipo							
	AA		AG		GG		Total	
Gênero	N	%	N	%	N	%	N	%
Masculino	70	46,67	54	44,26	09	28,13	133	43,75
Feminino	80	53,33	68	55,74	23	71,88	171	56,25
Total	150	100	122	100	32	100	304	100

Em relação às sorologias positiva e negativa (grupo controle) para *T. cruzi*, foram genotipados 295 indivíduos, sendo 161 (54,60%) com sorologia negativa e 134 (45,40%), com sorologia positiva. Dos 147 (49,84%) indivíduos genotipados como AA, 75 (51,02%) foram soronegativos e 72 (48,98%) soropositivos. Tratando-se do genótipo heterozigoto, 64 (54,70%) eram soronegativos e 53 (45,30%) soropositivos. Em relação ao genótipo GG, polimórfico, 22 (70,97%) eram soronegativos e 09 (29,03%) soropositivos (**tabela 04**). Não pôde ser observada diferença estatisticamente significativa entre o genótipo e a sorologia apresentada pelos indivíduos da amostra (χ^2 ; p= 0,128). A frequência dos alelos A e G, no grupo de indivíduos com sorologia negativa, foi de 66,46% e 33,54%, respectivamente. Entre os soropositivos, a frequência foi de 73,50% e 26,50% para os alelos A e G, respectivamente.

Tabela 04- Distribuição das frequências das sorologias, positiva e negativa, para *T. cruzi* em relação aos genótipos do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252.

	Genótipos							
	AA		AG		GG		Total	
Sorologia	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativa	75	51,02	64	54,70	22	70,97	161	54,60
Positiva	72	48,98	53	45,30	09	29,03	134	45,40
Total	147	100	117	100	32	100	295	100

Considerando-se as formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica, foi possível genotipar 123 indivíduos. Entre os 70 (56,90%) indivíduos com a forma cardíaca da doença, 31 (46,97%) apresentaram o genótipo AA, 34 (68,00%) o genótipo AG e 05 (71,43%) o genótipo GG. No grupo de 53 (53,03%) indivíduos com a forma clínica indeterminada, a distribuição dos genótipos AA, AG e GG foi de respectivamente, 35 (53,03%), 16 (32,00%) e 02 (28,57%) (**tabela 05**). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos e a manifestação clínica desenvolvida pelo indivíduo (X^2 ; $p= 0,055$). Em relação à frequência alélica, o alelo A teve frequência de 68,60% no grupo de indivíduos com cardiopatia e de 81,10% entre o grupo de indeterminados e o alelo G de 31,40% e 18,90%, respectivamente. Ainda, foi avaliada a probabilidade de o indivíduo, sendo portador do genótipo GG ou AG de desenvolver a forma cardíaca da doença. Para o genótipo GG, foi encontrado um *Odds Ratio* (OR) de 2,8 (95% CI= 0,511 – 15,600) e para o genótipo AG, um OR de 2,4 (95% CI= 1,115 – 5,161), em relação ao genótipo AA.

Tabela 05- Distribuição das frequências das formas clínicas cardíaca e indeterminada em relação aos genótipos do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252.

Forma Clínica	Genótipos							
	AA		AG		GG		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Cardíaca	31	46,97	34	68,00	05	71,43	70	56,90
Indeterminada	35	53,03	16	32,00	02	28,57	53	43,10
Total	66	100	50	100	07	100	123	100

Para se verificar se existe alguma associação entre a presença do alelo G e o desenvolvimento da sorologia positiva ou forma clínica, os genótipos GG e AG foram agrupados em “presença do alelo G” que, segundo dados da literatura, está associada com maior produção de LT- α (MESSER et al., 1991; OZAKI et al., 2002).

Associando-se a presença do alelo G com o gênero do indivíduo, não foi observada diferença estatisticamente significativa (χ^2 ; p= 0,265). De um total de 304 indivíduos, 133 (43,75%) foram do gênero masculino, sendo que 70 (46,98%) não apresentaram o alelo G e 63 (40,65%) apresentaram o alelo G (genótipos GG e AG). Dos indivíduos do gênero feminino, 79 (53,02%) não apresentaram o alelo G e 92 (59,35%) o apresentaram (**tabela 06**).

Tabela 06- Distribuição da presença do alelo G do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252 em relação ao gênero dos indivíduos da amostra.

Gênero						
		Masculino		Feminino		Total
Presença de G	N	%	N	%	N	%
Não	70	46,98	79	53,02	149	100
Sim	63	40,65	92	59,35	155	100
Total	133	43,75	171	56,25	304	100

Foi observada a frequência da presença do alelo G em relação às sorologias negativa e positiva para *T. cruzi* dos indivíduos estudados. Não houve associação entre a presença do alelo G e a sorologia apresentada pelo indivíduo (X^2 ; $p= 0,221$). Dos 147 indivíduos que apresentaram o alelo G, 75 (51,02%) foram soronegativos e 72 (48,98%) soropositivos. Dos 148 indivíduos com ausência do alelo G, 86 (58,11%) tinham sorologia negativa e 62 (41,89%) sorologia positiva para *T. cruzi* (**tabela 07**).

Tabela 07- Distribuição da presença do alelo G do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252 em relação às sorologias negativa e positiva para *T. cruzi*.

Sorologia						
		Negativa		Positiva		Total
Presença de G	N	%	N	%	N	%
Não	75	51,02	72	48,98	147	100
Sim	86	58,11	62	41,89	148	100
Total	161	54,58	134	45,42	295	100

Analisando-se se a presença do alelo G poderia influenciar o desenvolvimento da forma cardíaca, esta foi comparada entre as formas clínicas cardíaca e indeterminada. Dos 66 indivíduos com ausência do alelo G, 31 (46,97%) foram classificados na forma cardíaca e 35 (53,03%) na forma indeterminada. Dos 57 indivíduos com presença de alelo G, 39 (68,42%) apresentaram a forma cardíaca e 18 (31,58%) a forma indeterminada (**tabela 08**). Essa diferença foi estatisticamente significativa (X^2 ; $p= 0,016$). Calculando-se a razão das chances (*Odds Ratio* – OR), foi encontrado um valor de 2,4 (95% CI= 1,169 – 5,120).

Tabela 08- Distribuição da presença do alelo G do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252 em relação às formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica.

	Forma Clínica					
	Cardíaca		Indeterminada		Total	
Presença de G	N	%	N	%	N	%
Não	31	46,97	35	53,03	66	100
Sim	39*	68,42	18	31,58	57	100
Total	70	56,90	53	43,10	123	100

3.3. Produção de LT- α por Células Mononucleares de Sangue Periférico

Os níveis de LT- α nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico, na ausência de estímulo (produção basal), após estímulo por fitohemaglutinina (PHA) ou por antígenos de *T. cruzi*, foram comparados nos tempos de 48 e 120 horas de cultura. Na ausência de estímulo, foi observado que após 120 horas de cultura há maior produção da citocina do que em 48 horas (Wilcoxon, $p= 0,015$) (**figura 02**). Quando o estímulo é a fitohemaglutinina, não há diferença estatisticamente significativa entre os dois momentos de dosagem (Wilcoxon, $p= 0,257$) (**figura 03**). Quando estimuladas com antígenos de *T. cruzi*, após 120 horas de cultura, as células produzem significativamente mais LT- α do que após 48 horas de cultura (Wilcoxon, $p < 0,0001$) (**figura 04**).

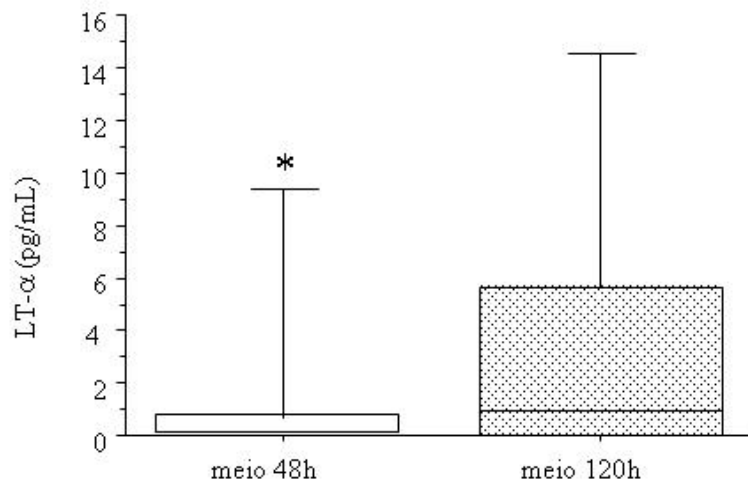


Figura 02 - Níveis de LT- α produzidos por células mononucleares de sangue periférico após 48 e 120 horas de cultura, na ausência de estímulo. ($n= 59$ para 48h e $n= 24$ para 120h). (Wilcoxon, $p= 0,015$).

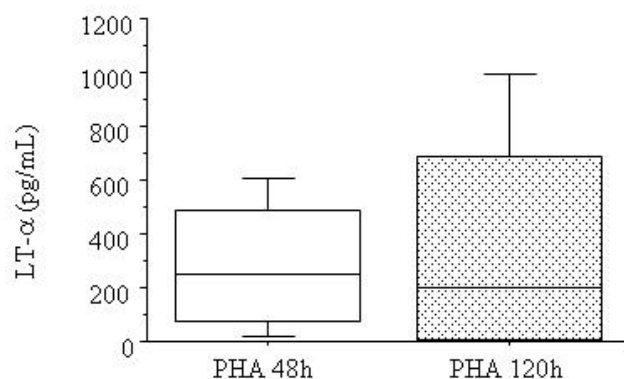


Figura 03- Níveis de LT- α produzidos por células mononucleares de sangue periférico após 48 e 120 horas de cultura, após estímulo com fitohemaglutinina. (n= 49 para 48h e n= 57 para 120h). (Wilcoxon, p= 0,257).

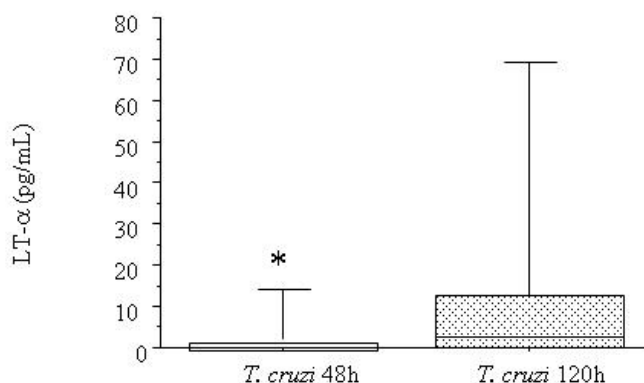


Figura 04- Níveis de LT- α produzidos por células mononucleares de sangue periférico após 48 e 120 horas de cultura, após estímulo com antígenos de *T. cruzi*. (n= 70 para 48h e n= 17 para 120h). (Wilcoxon, p< 0,0001).

A produção de LT- α foi comparada entre indivíduos com sorologias negativa e positiva para *T. cruzi*. Quando as células não receberam estímulo, após 48 horas de cultura, não foi observada diferença na produção de citocina entre indivíduos soronegativos e soropositivos (Mann-Whitney, p= 0,081) (**figura 05**). Após estímulo com antígeno de *T. cruzi*, em 48 horas de cultura, os indivíduos com sorologia positiva produzem significativamente mais LT- α do que os indivíduos com sorologia negativa (Mann-Whitney, p< 0,0001) (**figura 05**). Quando o estímulo foi a PHA, após 48 horas de cultura,

não se observou diferença na produção da citocina entre os dois grupos estudados (Mann-Whitney, $p=0,243$) (figura 06).

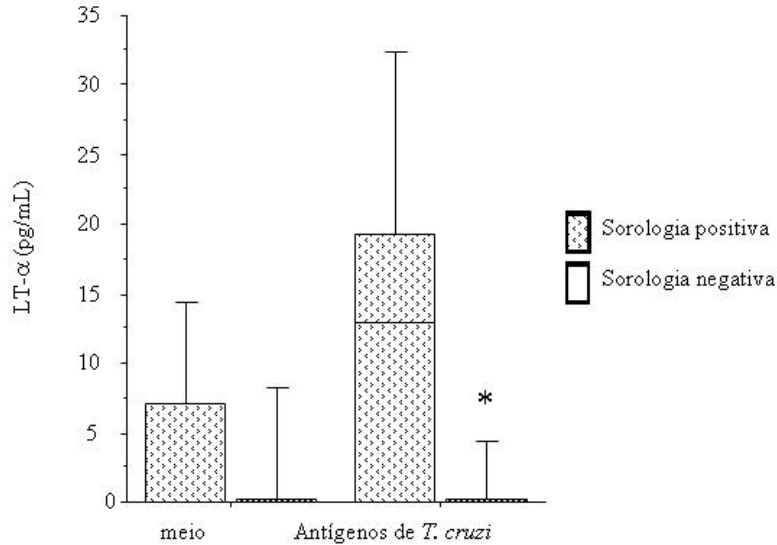


Figura 05- Níveis de LT- α , em indivíduos com sorologias negativa e positiva para *T. cruzi* na ausência de estímulo e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, em cultura de 48 horas. Indivíduos com sorologia positiva ($n=29$) e indivíduos com sorologia negativa ($n=85$), teste Mann-Whitney, $p=0,081$; $p<0,0001$, respectivamente.

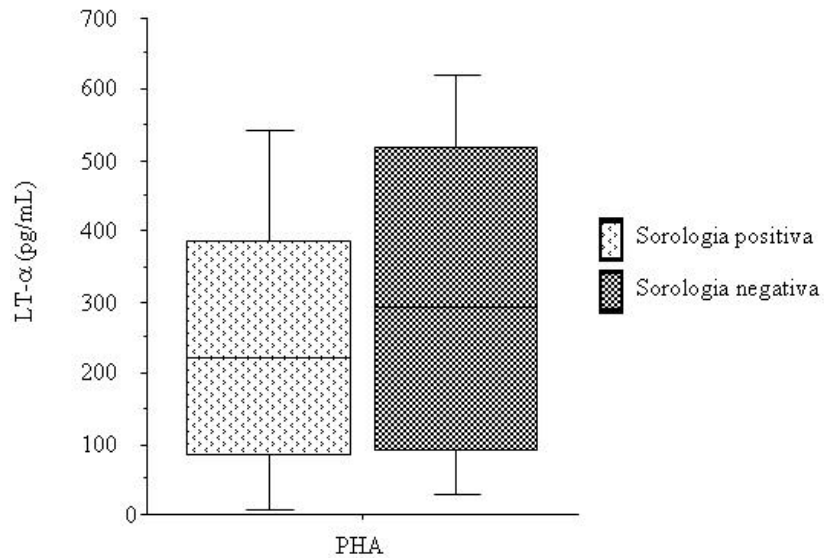


Figura 06- Níveis de LT- α , em indivíduos com sorologias negativa e positiva para *T. cruzi* após estímulo com fitohemaglutinina, em cultura de 48 horas. Indivíduos com sorologia positiva ($n=29$) e indivíduos com sorologia negativa ($n=86$), teste Mann-Whitney, $p=0,243$.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

As tabelas que seguem no texto (**tabelas 09-16**) representam o conjunto dos dados dos níveis de LT- α agrupados, mostrando os valores das medianas e valores mínimo e máximo em cada condição estudada.

Tabela 09- Valores da produção de LT- α , expressos em pg/mL, em indivíduos com sorologias positiva e negativa para *T. cruzi*, em culturas de 48 horas.

	Meio	Antígenos de <i>T. cruzi</i>	PHA
soropositivos	0 (0-587,2)	12,9 (0-132,2)	222,97 (0-717,55)
soronegativos	0 (0-247,1)	0 (0-17,61)	292,75 (0-1417,90)

Os valores são expressos em mediana (valor mínimo – valor máximo).

A mesma análise foi realizada para as células cultivadas por 120 horas. Células de indivíduos soropositivos cultivadas apenas em meio de cultura produziram níveis significativamente mais elevados de citocina do que os indivíduos soronegativos (Mann-Whitney, $p= 0,0007$) (**figura 07**). Quando o estímulo foi a PHA, células de indivíduos soronegativos produziram significativamente maiores níveis de LT- α (Mann-Whitney, $p= 0,026$) (**figura 08**). Entretanto, quando estimuladas com antígenos de *T. cruzi*, não houve diferenças significativas entre pacientes e controles (Mann-Whitney, $p= 0,90$) (**figura 07**).

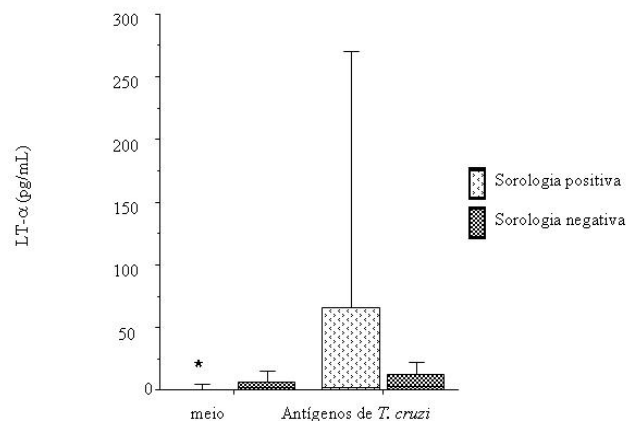


Figura 07- Níveis de LT- α , em indivíduos com sorologias negativa e positiva para *T. cruzi* na ausência de estímulo e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, em cultura de 120 horas.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

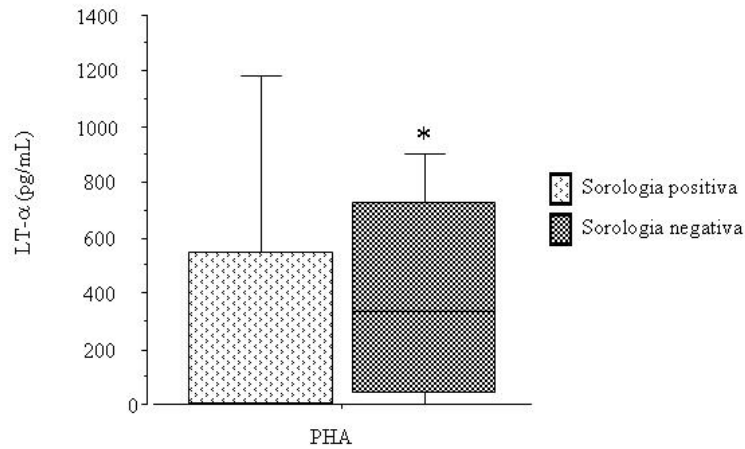


Figura 08- Níveis de LT- α , em indivíduos com sorologias negativa e positiva para *T. cruzi*, após estímulo com fitohemaglutinina, em cultura de 120 horas. Indivíduos com sorologia positiva (n= 31) e indivíduos com sorologia negativa (n= 77), teste Mann-Whitney, p= 0,028.

Tabela 10- Valores da produção de LT- α , expressos em pg/mL, em indivíduos com sorologias positiva e negativa para *T. cruzi*, em culturas de 120 horas.

	Meio	Antígenos de <i>T. cruzi</i>	PHA
soropositivos	0,128 (0-14,6)	1,27 (0-1178,1)	8,7 (0-1417,9)
soronegativos	1,9 (0-80,3)	3,6 (0-480,2)	337 (0-1417,9)

Os valores são expressos em mediana (valor mínimo – valor máximo).

Em relação às formas clínicas cardíaca e indeterminada, após cultura de 48 horas, não houve diferença significativa na produção da citocina entre os pacientes com a forma cardíaca e indeterminada da doença de Chagas, na ausência de estímulo (Mann-Whitney, p= 0,132) (**figura 09**) e após estímulo com PHA (Mann-Whitney, p= 0,902) (**figura 10**). Quando as células foram estimuladas com antígenos de *T. cruzi*, uma produção significativamente maior de citocina foi observada pelos pacientes cardíacos (Mann-Whitney, p= 0,01) (**figura 09**).

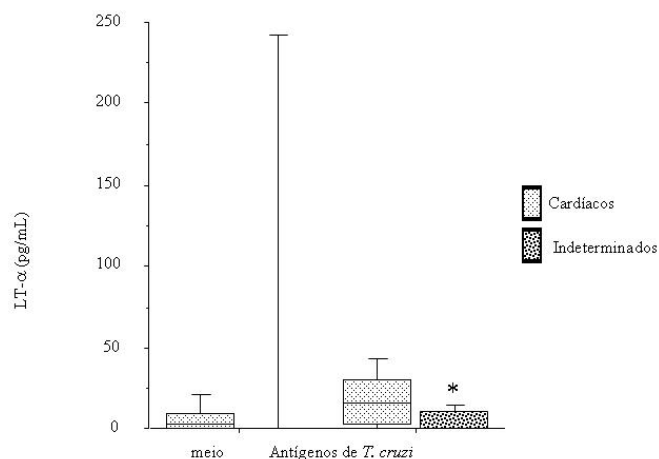


Figura 09- Níveis de LT- α , em indivíduos com as formas clínicas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas crônica, na ausência de estímulo e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, em cultura de 48 horas. Indivíduos com a forma cardíaca (n= 12) e indivíduos com a forma indeterminada (n= 11), teste Mann-Whitney, p= 0,132; p= 0,01, respectivamente.

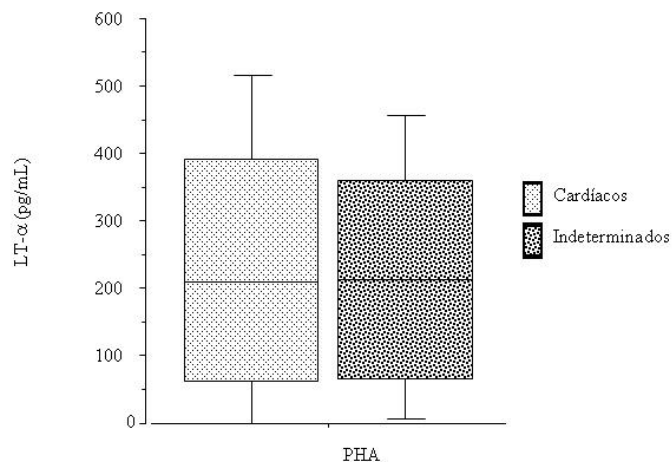


Figura 10- Níveis de LT- α , em indivíduos com as formas clínicas cardíaca e indeterminada após estímulo com fitohemaglutinina, em cultura de 48 horas. Indivíduos com a forma cardíaca (n= 12) e indivíduos com a forma indeterminada (n= 11), teste Mann-Whitney, p= 0,902.

Tabela 11- Valores da produção de LT- α , expressos em pg/mL, em indivíduos com as formas clínicas cardíaca e indeterminada, em culturas de 48 horas.

	Meio	Antígenos de <i>T. cruzi</i>	PHA
Forma cardíaca	2,65 (0-29,9)	15,3 (0-66,9)	208,85 (0-587,2)
Forma Indeterminada	0 (0-587,2)	0 (0-15,5)	211,7 (6,1-534,64)

Os valores são expressos em mediana (valor mínimo – valor máximo).

Comparando-se a produção de LT- α por sobrenadantes de cultura de 48 horas, após na ausência de estímulo e após estimulação por antígenos de *T. cruzi*, entre os diferentes genótipos para a posição +252 do gene da LT- α , não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p= 0,639$; $p= 0,363$, respectivamente) (**figura 11**). Quando a produção de LT- α por sobrenadantes de cultura foi comparada após estímulo com PHA também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis, $p= 0,530$) (**figura 12**).

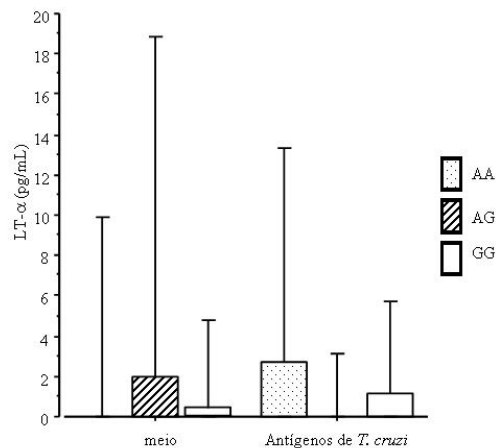


Figura 11- Níveis de LT- α em relação ao polimorfismo na posição +252, na ausência de estímulo e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, em cultura de 48 horas. Indivíduos AA (n= 45 para meio e Tc), indivíduos AG (n= 33 para meio e Tc) e indivíduos GG (n= 13 para meio e Tc), teste Kruskal-Wallis, $p= 0,639$; $p= 0,363$, respectivamente.

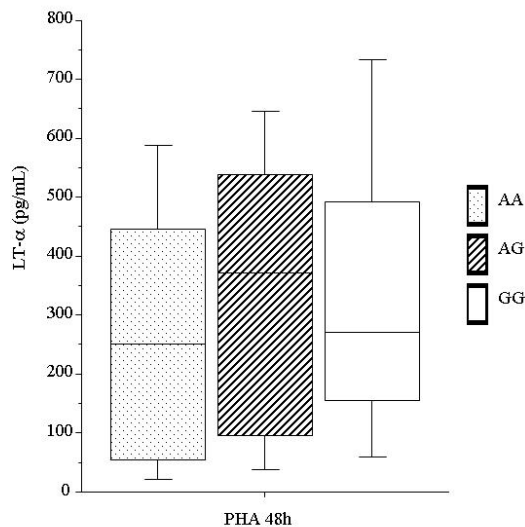


Figura 12- Níveis de LT- α em relação ao polimorfismo na posição +252, após estímulo com fitohemaglutina em cultura de 48 horas. Indivíduos AA (n= 45 para meio e Tc), indivíduos AG (n= 33 para meio e Tc) e indivíduos GG (n= 13 para meio e Tc), teste Kruskal-Wallis, $p= 0,530$, respectivamente.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Tabela 12- Valores da produção de LT- α , expressos em pg/mL, em indivíduos com os genótipos AA, AG e GG do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252, em culturas de 48 horas.

	Meio	Antígenos de <i>T. cruzi</i>	PHA
AA	0 (0-247,1)	0 (0-33,2)	251,525 (0-826,4)
AG	0 (0-587,2)	0 (0-29,5)	372,2 (0-784,9)
GG	0 (0-10,51)	0 (0-16,5)	270,7 (25,47-1178,1)

Os valores são expressos em mediana (valor mínimo – valor máximo).

A produção de LT- α após cultura de 120 horas também foi comparada entre os genótipos do polimorfismo da LT- α , posição +252. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção da citocina na ausência de estímulo (Kruskal-Wallis, $p= 0,312$), após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Kruskal-Wallis, $p= 0,996$) (**figura 13**) ou após estímulo com PHA (Kruskal-Wallis, $p= 0,527$) (**figura 14**).

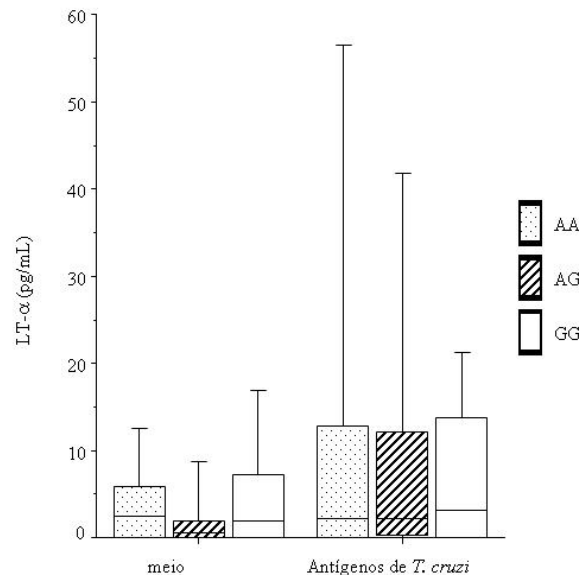


Figura 13- Níveis de LT- α em relação ao polimorfismo na posição +252, na ausência de estímulo e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, em cultura de 120 horas. Indivíduos AA (n= 40 na ausência de estímulo e n= 38 após estímulo com antígenos de *T. cruzi*), indivíduos AG (n= 35 na ausência de estímulo e n= 34 após estímulo com antígenos de *T. cruzi*) e indivíduos GG (n= 12 para as duas condições), teste Kruskal-Wallis, $p= 0,312$; $p= 0,996$, respectivamente.

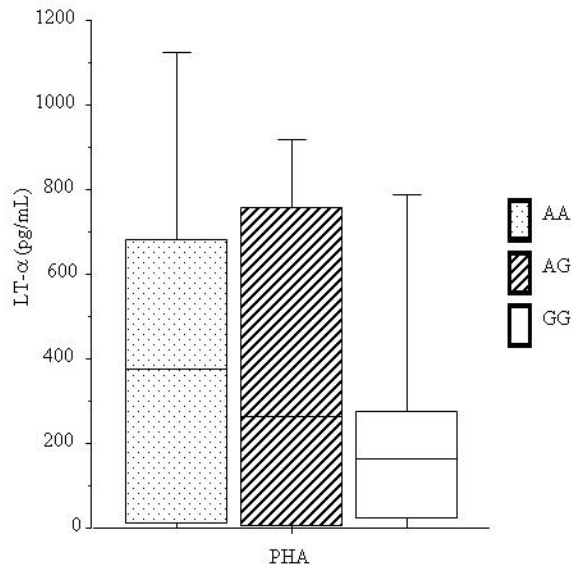


Figura 14- Níveis de LT- α em relação ao polimorfismo na posição +252, após estímulo com fitohemaglutinina em cultura de 120 horas. Indivíduos AA (n= 41), indivíduos AG (n= 35) e indivíduos GG (n= 12), teste Kruskal-Wallis, p= 0,527.

Tabela 13- Valores da produção de LT- α , expressos em pg/mL, em indivíduos com os genótipos AA, AG e GG do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252, em culturas de 120 horas.

	Meio	Antígenos de <i>T. cruzi</i>	PHA
AA	2,35 (0-62,2)	2,05 (0-1178,1)	374,5 (0-1417,9)
AG	0,5 (0-80,3)	2,2 (0-297,8)	262,5 (0-1417,9)
GG	2,0 (0-21,5)	3,2 (0-25,1)	162,35 (0-1222)

Os valores são expressos em mediana (valor mínimo – valor máximo).

Analisando-se a produção de LT- α em relação à presença do alelo G (alto produtor), em culturas de 48 horas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na produção da citocina em relação à presença ou ausência do alelo G, em cultura usando apenas meio (Mann-Whitney, p= 0,316) (**figura 15**), e após estímulos com PHA (Mann-Whitney, p= 0,260) (**figura 16**) e antígenos de *T. cruzi* (Mann-Whitney, p= 0,145) (**figura 15**).

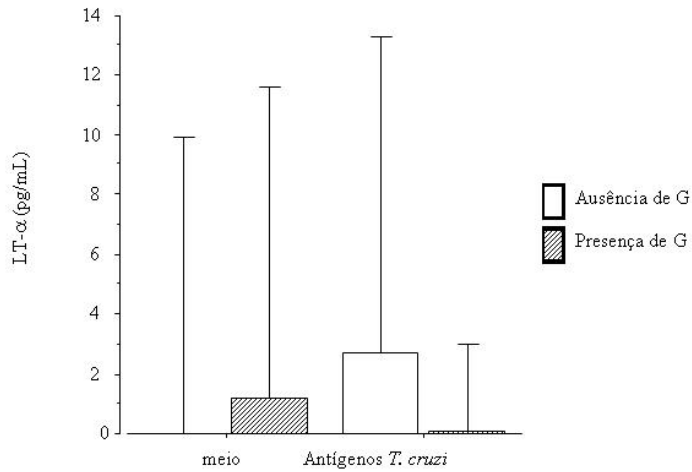


Figura 15- Níveis de LT- α , em relação à presença do alelo G do polimorfismo na posição +252, na ausência de estímulo e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, em cultura de 48 horas. Ausência do alelo G (n= 45), presença do alelo G (n= 46), teste Mann-Whitney, p= 0,316; p= 0,145, respectivamente.

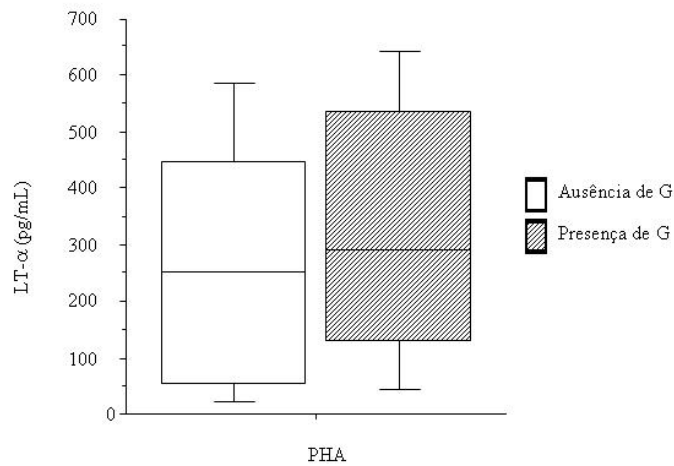


Figura 16- Níveis de LT- α , em relação à presença do alelo G do polimorfismo na posição +252, após estímulo com fitohemaglutinina, em cultura de 48 horas. Ausência do alelo G (n= 46), presença do alelo G (n= 46), teste Mann-Whitney, p= 0,260.

Tabela 14- Valores da produção de LT- α , expressos em pg/mL, em indivíduos com os presença ou ausência do alelo G, do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252, em culturas de 48 horas.

	Meio	Antígenos de <i>T. cruzi</i>	PHA
Presença de G	0 (0-587,2)	0 (0-29,5)	290,7 (0-1178,1)
Ausência de G	0 (0-247,1)	0 (0-33,2)	251,525 (0-826,4)

Os valores são expressos em mediana (valor mínimo – valor máximo).

Foi realizada análise em relação à presença e ausência do alelo G, separando-se os indivíduos com sorologias negativa e positiva para *T. cruzi*. Nos indivíduos com sorologia negativa para *T. cruzi*, não se observaram diferenças estatisticamente significativas na produção da citocina em relação à presença do alelo G na ausência de estímulos (Mann-Whitney, $p= 0,902$) (**figura 17**) ou após estímulo com PHA (Mann-Whitney, $p= 0,074$), em culturas de 48 horas, embora haja uma tendência a uma maior produção nos portadores do alelo G nessa condição (**figura 18**).

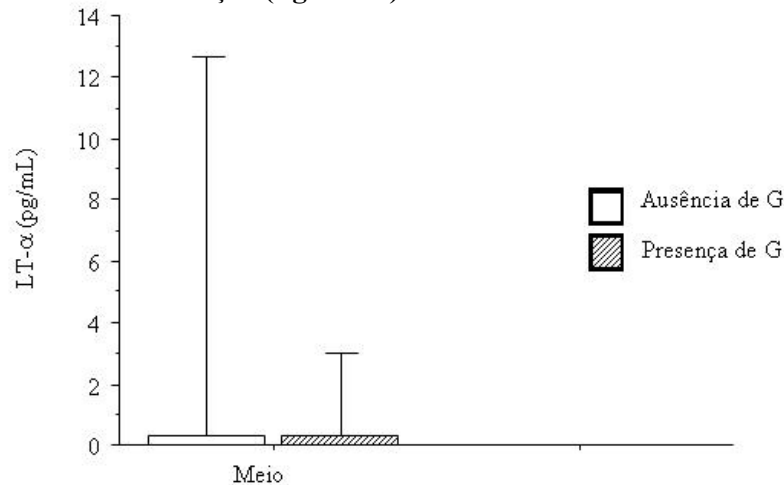


Figura 17- Níveis de LT- α em indivíduos com sorologia negativa para *T. cruzi*, em relação à presença do alelo G do polimorfismo na posição +252, na ausência de estímulo, em cultura de 48 horas.

Ausência do alelo G (n= 36), presença do alelo G (n= 38), teste Mann-Whitney, $p=0,902$.

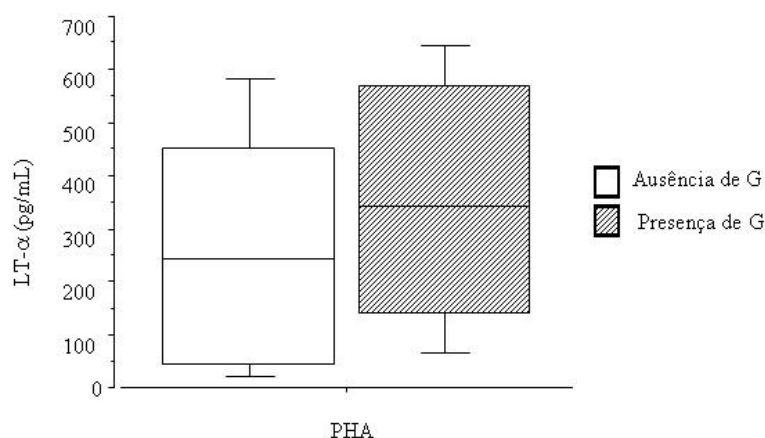


Figura 18- Níveis de LT- α em indivíduos com sorologia negativa para *T. cruzi*, em relação à presença do alelo G do polimorfismo na posição +252, após estímulo fitohemaglutinina, em cultura de 48 horas. Ausência do alelo G (n=37), presença do alelo G (n= 38), teste Mann-Whitney, p= 0,074.

Tabela 15- Valores da produção de LT- α , expressos em pg/mL, em indivíduos soronegativos com os genótipos AA, AG e GG do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252, em culturas de 48 horas.

	Meio	Antígenos de <i>T. cruzi</i>	PHA
AA	0 (0-247,1)	0 (0-17,61)	243,68 (0-826,4)
AG	0 (0-38,72)	0 (0-4,34)	393,75 (0-784,9)
GG	0 (0-10,51)	0 (0-3,0)	268,11 (25,47-1178,1)

Os valores são expressos em mediana (valor mínimo – valor máximo).

Analisando-se os indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* separadamente, em culturas de 48 horas, observou-se que, na ausência de estímulos, os portadores do alelo G produzem significativamente mais LT- α do que os não portadores (Teste Mann-Whitney, p= 0,043) (**figura 19**). Após a estimulação com antígenos do parasito, não houve diferença na produção da citocina entre portadores e não portadores do alelo G (Teste Mann-Whitney, p= 0,665) (**figura 19**). O mesmo foi observado após estimulação com PHA (Teste Mann-Whitney, p= 0,211) (**figura 20**).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

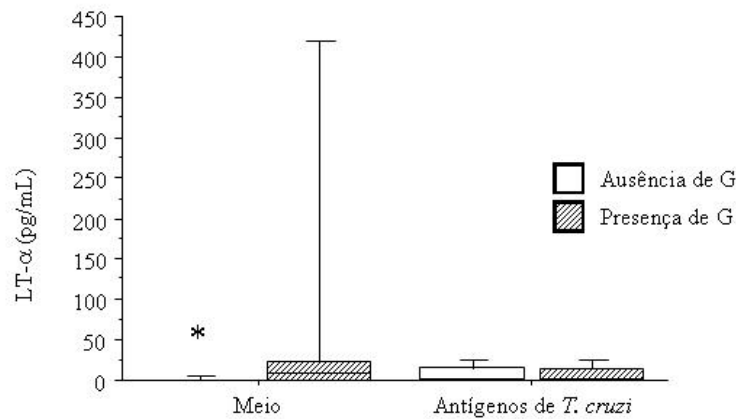


Figura 19- Níveis de LT- α em indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi*, em relação à presença do alelo G do polimorfismo na posição +252, na ausência de estímulo e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, em cultura de 48 horas.

Ausência do alelo G (n= 09), presença do alelo G (n= 08), teste Mann-Whitney, $p=0,043$; $p= 0,665$, respectivamente.

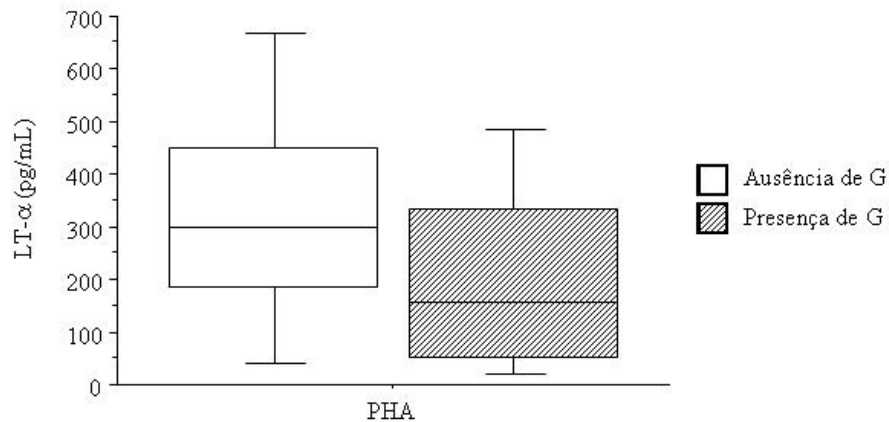


Figura 20- Níveis de LT- α em indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi*, em relação à presença do alelo G do polimorfismo na posição +252, após estímulo fitohemaglutinina, em cultura de 48 horas.

Ausência do alelo G (n=09), presença do alelo G (n= 08), teste Mann-Whitney, $p= 0,211$.

Tabela 16- Valores da produção de LT- α , expressos em pg/mL, em indivíduos soropositivos com os genótipos AA, AG e GG do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252, em culturas de 48 horas.

	Meio	Antígenos de <i>T. cruzi</i>	PHA
AA	0 (0-6,3)	0 (0-33,2)	299,59 (0-717,55)
AG	11,69 (0-587,2)	2,2 (0-29,5)	86,2 (6,1-534,64)
GG	0 (0-0)	16,5 (16,5-16,5)	290,2 (290,2-290,2)

Os valores são expressos em mediana (valor mínimo – valor máximo).

3.4. Expressão de LT- α por Linfócitos T

A expressão de LT- α por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi avaliada no total de indivíduos (com a forma indeterminada, n= 07 e com ICC, n= 12) por citometria de fluxo. Os linfócitos T CD8⁺ expressaram significativamente mais LT- α do que os linfócitos T CD4⁺ na ausência de estímulos (Teste T pareado, p= 0,003) e após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Teste T pareado, p= 0,004) (**figura 21**). Quando a expressão de LT- α foi comparada entre cada subtipo de linfócito T (CD4⁺ ou CD8⁺), houve diminuição significativa do número de linfócitos T CD4⁺ expressando LT- α após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Teste T pareado, p= 0,001) (**figura 21**). Entretanto, quando a mesma comparação foi realizada entre o grupo de linfócitos T CD8⁺ não foi observada diferença estatisticamente significativa (Teste T pareado, p= 0,457) (**figura 21**).

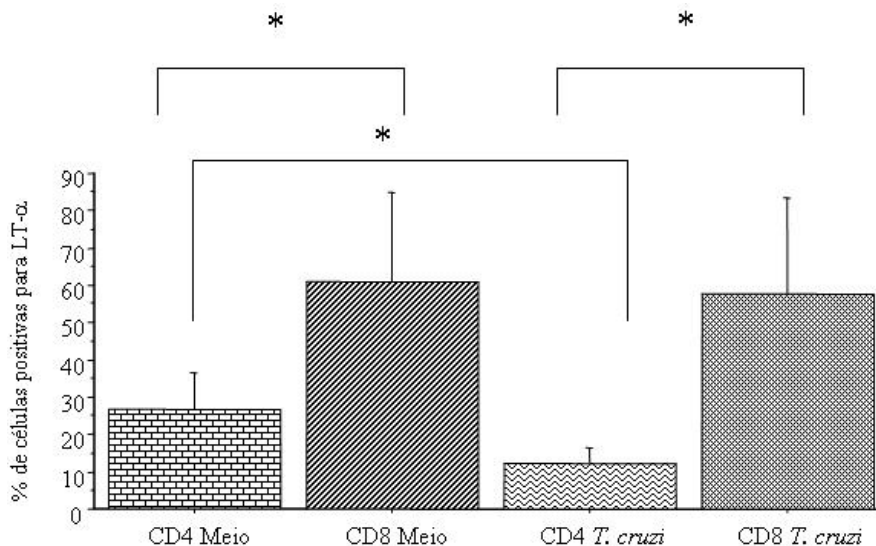


Figura 21- Porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivas para LT-α na ausência de estímulos e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, no grupo total de pacientes (forma indeterminada e pacientes com ICC). Teste T pareado, p < 0,05.

A expressão de LT-α por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes com a forma indeterminada e com a forma cardíaca e manifestações de ICC foi avaliada. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de LT-α por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, na ausência de estímulos, em pacientes com ICC (Teste T pareado, p= 0,054) (**figura 22**). A mesma comparação foi realizada entre os indivíduos com a forma indeterminada e foi observado que os linfócitos T CD8⁺ expressaram significativamente mais LT-α do que os T CD4⁺, na ausência de estímulos (Teste T pareado, p= 0,009) (**figura 22**). Quando as células foram estimuladas com antígenos de *T. cruzi* e ainda comparando-se os linfócitos T CD4⁺ com os linfócitos T CD8⁺, nos pacientes com ICC, não houve diferença na expressão da citocina (Teste T pareado, p= 0,06) (**figura 22**). Avaliando-se os pacientes com a forma indeterminada, houve expressão significativamente maior de LT-α por linfócitos T CD8⁺ do que por linfócitos T CD4⁺ (Teste T pareado, p= 0,02) (**figura 22**).

Comparando-se linfócitos T CD4⁺ não estimulados com linfócitos T CD4⁺ estimulados com antígenos de *T. cruzi*, foi verificada maior expressão da citocina entre os

linfócitos na ausência de estímulo em relação aos estimulados por antígenos de *T. cruzi* (Teste T pareado, $p= 0,006$), nos pacientes com ICC. No grupo de pacientes com a forma indeterminada, não houve diferença na expressão de LT- α na ausência de estímulos ou após estimulação com antígenos de *T. cruzi* (Teste T pareado, $p= 0,204$) (**figura 22**). A mesma análise foi realizada com os linfócitos T CD8⁺ e também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de LT- α no grupo de pacientes com ICC (Teste T pareado, $p= 0,121$) e no grupo de pacientes com a forma indeterminada (Teste T pareado, $p= 0,849$) (**figura 22**).

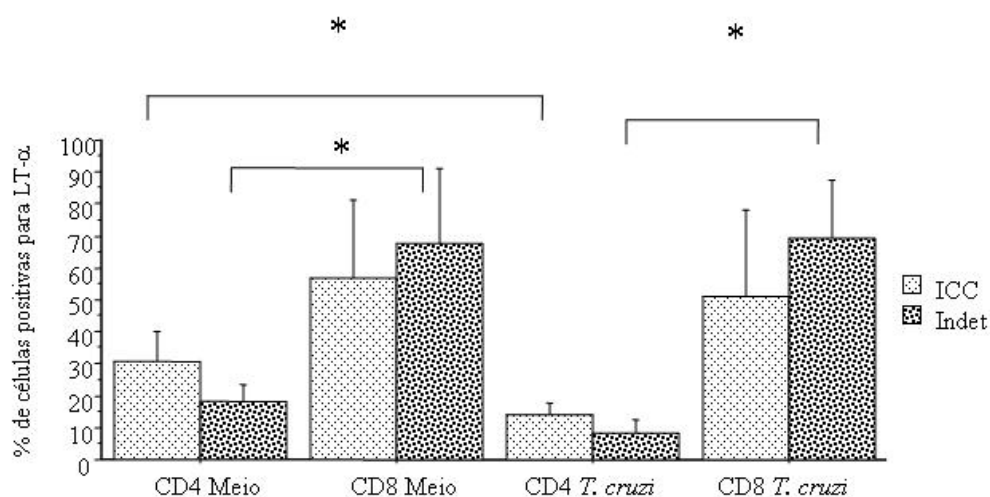


Figura 22- Porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivas para LT- α na ausência de estímulos e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, de pacientes com a forma indeterminada ou com insuficiência cardíaca congestiva. Teste T pareado, $p < 0,05$.

Analisando-se se há diferença na expressão da citocina entre pacientes com ICC e com a forma indeterminada nos diferentes subtipos de linfócitos T, foi observado que não há diferença na expressão por linfócitos T CD4⁺ na ausência de estímulo (Teste T não pareado, $p= 0,07$) ou após estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Teste T não pareado, $p= 0,079$). Em relação aos linfócitos T CD8⁺, não foram verificadas diferenças na expressão de LT- α na ausência de estímulos (Teste T não pareado, $p= 0,357$) ou depois de estímulo com antígenos de *T. cruzi* (Teste T não pareado, $p= 0,132$) (**figura 23**).

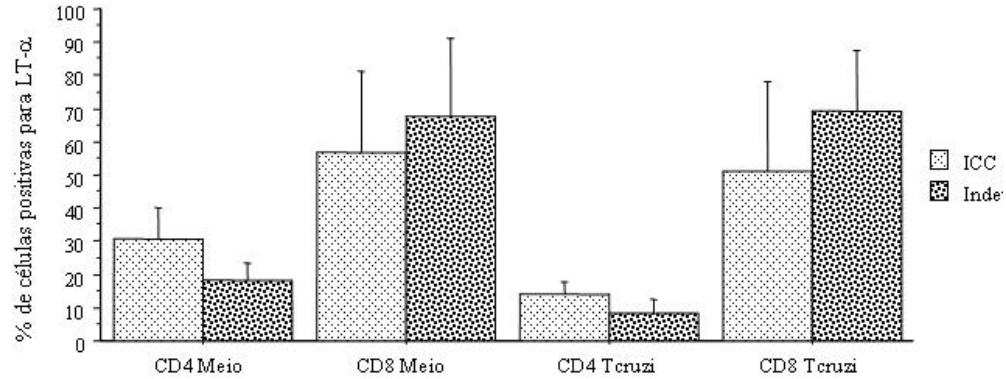


Figura 23- Porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ positivas para LT- α na ausência de estímulos e após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, de pacientes com a forma indeterminada ou com insuficiência cardíaca congestiva. Forma indeterminada (nCD4⁺= 03, nCD8⁺= 07), indivíduos com insuficiência cardíaca congestiva (nCD4⁺= 06, nCD8⁺= 12).

O papel de polimorfismos do hospedeiro desperta interesse da comunidade científica há várias décadas. O relato da importância do controle genético do hospedeiro na suscetibilidade/resistência a doenças parasitárias demonstrou que o mesmo se aplica em situações de relação parasito-hospedeiro de grande complexidade (MARQUET et al., 1996; ALCAÏS et al., 1997; DESSEIN et al., 1999; RODRIGUES et al., 1999). O que chama atenção em áreas endêmicas é a variabilidade de manifestações clínicas apresentadas pelo hospedeiro, que variam desde a ausência de sintomas até as formas mais graves da doença, culminando com a incapacidade ou morte do indivíduo.

Em relação à doença de Chagas crônica, um aspecto de relevância é a razão de alguns indivíduos permanecerem aparentemente assintomáticos e outros, cerca de 30%, evoluírem para a forma cardíaca da doença. Acreditando-se que a genética do hospedeiro possa ser um fator fundamental no desenvolvimento dessa manifestação e baseando-se em estudos que apontam para a agregação familiar na CCC (ZICKER et al., 1990), esse estudo foi realizado. Além disso, a expressão de muitas citocinas envolvidas na imunorregulação pode ser influenciada por polimorfismos funcionais no *locus* de seus genes. Esses polimorfismos podem contribuir para a suscetibilidade e a gravidade de doenças inflamatórias (BALDING et al., 2002), ou nas quais a inflamação apresenta papel crucial, como a doença de Chagas.

Como discutido anteriormente, várias são as estratégias utilizadas para se estudar as influências de um gene sob determinada doença. Essas podem ser familiares ou estudos do tipo caso-controle. Os últimos necessitam de eleger um gene candidato. A escolha do gene candidato baseia-se em sua função biológica e em seu papel na patogênese da doença estudada. Estes dados são obtidos a partir de estudos experimentais em cromossomos homólogos ou pela semelhança com outras doenças (ABEL; DESSEIN, 1997; SEGAL; HILL, 2003; BURGNER; JAMIESON; BLACKWELL, 2004).

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

Na doença de Chagas crônica, vários estudos têm sido realizados nesse aspecto e vários foram os genes eleitos, desde genes do HLA, importantes na apresentação de antígenos (FERNANDEZ-MESTRE et al., 1998; DEGHAIDE; DANTAS; DONADI, 1998; COLORADO et al., 2000; FAÉ et al., 2000; NIETO et al., 2000; CRUZ-ROBLES et al., 2004) até genes de diferentes citocinas do sistema imunológico, especialmente aqueles localizados no cromossomo 6, próximos aos genes do HLA (CAMPELO et al., 2007; DRIGO et al., 2007; RAMASAWMY et al., 2007 DRIGO et al., 2006; RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2005; BERAÚN et al., 1998).

A escolha da LT- α como gene candidato nesse estudo justifica-se pela sua importância na organização e manutenção da resposta inflamatória (KRATZ et al., 1996), pela indução e recrutamento de moléculas de adesão, tais como VCAM, ICAM, e-selectina (CUFF et al., 1998; CUFF; SACCA; RUDDLE, 1999; HJELMSTRÖM et al., 2000) e também pela sua localização cromossômica, no cromossomo 6, próxima a genes do HLA (MAKHTADZE et al., 1998). Entretanto, na literatura existem apenas dois trabalhos a respeito da importância da LT- α na doença de Chagas. O primeiro, em doença de Chagas experimental, demonstra o papel desta citocina no controle da proliferação de *T. cruzi* de forma direta (KRASSNER et al., 1982). O outro, um estudo imunogenético, mostrou associação de haplótipo (LTA+80A/+252G) no gene da LT- α com a progressão para a forma cardíaca da doença (RAMASAWMY et al., 2007). Porém, não há relatos na literatura de estudos como este, em que foi possível mostrar a associação da presença do polimorfismo com a progressão para a forma cardíaca, confirmando resultados de Ramasawmy e colaboradores (2007), a produção da citocina por sobrenadantes de cultura e o principal subtipo de linfócito T que expressa LT- α .

Não foi possível associar a presença do polimorfismo e a frequência dos alelos A e G do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252, com o gênero dos indivíduos da

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

amostra. Segundo relatos, a idade e gênero são menos importantes, pois raramente se alteram em decorrência do recrutamento e estratificação da amostra selecionada (SEGAL; HILL, 2003; FRODSHAM; HILL, 2004).

Foi avaliado, em indivíduos de área endêmica para doença de Chagas, se a presença de polimorfismo no gene da LT- α , posição +252 pode ser associada com a presença de infecção (sorologia positiva) por *T. cruzi* e também sua influência no desenvolvimento da forma cardíaca da doença. Quando se analisou a associação entre os genótipos do polimorfismo estudado e a presença de sorologia positiva ou negativa para *T. cruzi*, não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significativas. Analisando-se as formas clínicas cardíaca e indeterminada, apesar de não ter sido observada diferença estatisticamente significativa entre a manifestação clínica apresentada pelo indivíduo (forma cardíaca ou indeterminada) e o genótipo, a probabilidade foi alta, com p de 0,055. A razão das chances (*Odds Ratio- OR*) foi de 2,8 vezes maior de desenvolver a forma cardíaca da doença para os portadores do genótipo GG e de 2,4 vezes maior para os portadores do genótipo heterozigoto, em relação aos portadores do genótipo AA. Esse resultado sugere que a presença do alelo G, mesmo em heterozigose, confere ao indivíduo um risco aumentado de desenvolver a forma cardíaca. Esta hipótese pode ser testada quando os genótipos GG e AG foram agrupados em “presença de G” e o genótipo AA em “ausência de G”. Houve frequência aumentada do alelo G entre os indivíduos com cardiopatia quando comparados com os indivíduos com a forma indeterminada, de forma significativa. O risco para os portadores do alelo G é 2,4 vezes maior de desenvolver a CCC do que os não portadores. No entanto, quando a “presença ou ausência” do alelo G foi associada com a sorologia apresentada pelo indivíduo, nenhuma associação foi observada.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

Na literatura, existem poucos trabalhos associando a presença desse polimorfismo com doenças infecciosas e parasitárias. Nenhuma associação foi encontrada entre esse polimorfismo e a suscetibilidade à leishmaniose visceral mediterrânea (MEDDEB-GARNAOUI et al., 2001). Entretanto, a presença do genótipo AA afetou a progressão da infecção pelo vírus da hepatite C (GOYAL et al., 2004) e está associada com a gravidade da doença hepática na hepatite B (SUNEETHA et al., 2006). O estudo em doença de Chagas associou a presença do polimorfismo apenas com a progressão para a CCC e não com a presença de sorologia negativa e positiva para *T. cruzi*. Foi encontrado que o alelo G foi significativamente mais frequente entre pacientes com CCC do que em assintomáticos (16% versus 8%) (RAMASAWMY et al., 2007), concordando com os resultados obtidos neste estudo (31,40% versus 18,90%). O fato do polimorfismo não estar associado com o desenvolvimento da sorologia possivelmente seja devido à importância de outras citocinas, também relacionadas à resposta imune inata e produzidas por macrófagos, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Já a LT- α , uma citocina com produção predominante por linfócitos T (WARE et al., 1995), relacionada à imunidade adaptativa, contribuiria mais com o desenvolvimento das lesões observadas na forma crônica.

O efeito funcional desse polimorfismo foi avaliado pela produção de LT- α por células mononucleares de sangue periférico, na ausência de estímulos, e após estimulação com PHA (estímulo inespecífico para linfócitos T) e antígenos de *T. cruzi*, em culturas de 48 e 120 horas.

As dosagens da LT- α foram realizadas nos dois tempos de cultura (48 e 120 horas), pois não há relatos de qual seria o pico da produção da citocina. Na ausência de estímulos e após estimulação com antígenos de *T. cruzi*, houve produção significativamente maior no tempo de 120 horas. O mesmo não se confirmou quando o estímulo foi a PHA,

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

possivelmente pelo fato de ser um estímulo inespecífico e de alta intensidade para linfócitos T.

Quando os indivíduos foram agrupados pela sorologia, foi encontrado que em cultura de 48 horas, após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, os indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* produziram mais LT- α do que os indivíduos soronegativos, o que pode ser explicado pela expansão clonal determinada pela presença do antígeno. Porém, não foram observadas diferenças na ausência de estímulos ou após estímulo por PHA. Já em culturas de 120 horas, maior produção da citocina por indivíduos soropositivos para *T. cruzi* foi observada na ausência de estímulos. Após estímulo com PHA, PBMCs de indivíduos soronegativos para *T. cruzi* produziram mais citocina do que os soropositivos, possivelmente desencadeada pela inespecificidade da estimulação e de sua alta intensidade.

Agrupados por forma clínica (cardíaca ou indeterminada), pacientes com a forma clínica cardíaca produziram significativamente mais LT- α do que os pacientes com a forma indeterminada, após estímulo por antígenos de *T. cruzi*. Esse resultado suporta os dados obtidos nesse trabalho, sugerindo que a LT- α pode contribuir para as lesões da fase crônica, enfatizado pelo achado de que os pacientes com CCC têm frequência aumentada do alelo G, que segundo dados da literatura, está associado com maior produção da citocina (MESSER et al., 1991; OZAKI et al., 2002).

Quando a produção da citocina foi avaliada entre os diferentes genótipos (AA, AG e GG) do polimorfismo da LT- α , posição +252, não foram encontradas diferenças em nenhuma das condições estudadas (ausência de estímulo, estímulo com PHA e antígenos de *T. cruzi*, em 48 e 120 horas de cultura). O mesmo foi observado quando o total de indivíduos foi agrupado por “presença e ausência” do alelo G. Entretanto, houve maior produção da citocina por indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* e portadores do alelo G na ausência de estímulos, confirmando os resultados obtidos por Messer e

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click “print”, select the “Broadgun pdfMachine printer” and that’s it! Get yours now!

colaboradores (1991) e por Ozaki e colaboradores (2002). Messer et al. (1991) avaliaram a produção da citocina por ELISA e observaram diferenças estatisticamente significativas nos dias 2, 3 e 4. No trabalho desenvolvido por Ozaki et al. (2002), a estratégia utilizada foi o ensaio de gene construído com luciferase, mostrando atividade transcricional aumentada para os portadores do alelo G, em pacientes com infarto do miocárdio.

Apesar da localização dentro de um íntron, esse polimorfismo parece apresentar efeito funcional. Acredita-se que haja uma ligação mais intensa de alguns fatores nucleares, tais como AP-1, jun e c-fos, na presença do alelo G (MESSER et al., 1991; OZAKI et al., 2002).

No entanto, não foi possível observar qualquer diferença na produção da citocina e genótipo apresentado pelo indivíduo nos resultados obtidos no presente trabalho. Possivelmente, devido à localização em uma região altamente polimórfica do genoma humano, há dificuldade em se observar a funcionalidade de um polimorfismo pela presença de desequilíbrio de ligação, especialmente com os alelos do HLA I e II (MAKHATADZE, 1998) ou outros polimorfismos no gene da LT- α . Ainda, o estímulo dado àquela célula pode não ser suficiente para demonstrar o efeito do polimorfismo. Há ainda o viés provocado pela própria doença, ou seja, os indivíduos com as diferentes formas clínicas desenvolveram mecanismos imunológicos distintos contra a presença do parasito. Pacientes com CCC parecem ter uma resposta inflamatória mais exarcebada do que pacientes com a forma indeterminada, que são mais imunorregulados aparentemente (HIGUCHI et al., 1987; SOUZA et al., 2004; DUTRA; ROCHA; TEIXEIRA, 2005). Esse fato pode resultar na observação de efeito funcional do polimorfismo em uma condição, mas não em outra. Além disso, o tempo de estimulação *in vitro* pode não ter sido adequado para demonstrar o efeito do polimorfismo. Não há estudos em doença de Chagas que associam a presença do polimorfismo com a produção de LT- α . Estudo recente mostrou a

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

associação do genótipo homozigoto para o alelo A da posição +80 do gene da LT- α com menores níveis plasmáticos de TNF- α (RAMASAWMY et al., 2007).

Em relação à expressão de LT- α por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, foi demonstrado que a LT- α é expressa predominantemente por linfócitos T CD8⁺, na ausência de estímulos e após estimulação com antígenos de *T. cruzi*. Esse resultado sugere que o principal subtipo de linfócito T produtor de LT- α é o CD8⁺. Estes resultados, associados à maior presença de linfócitos T CD8⁺ no exsudato inflamatório do coração de pacientes com CCC, reforça a hipótese da importância da LT- α na patogênese da lesão cardíaca (REIS et al., 1993; HIGUCHI et al., 1997). Ainda, a expressão predominante de LT- α por esse tipo celular indica que essa citocina pode ter importante papel na organização do infiltrado inflamatório de pacientes com CCC. A LT- α tem importância na organização e manutenção do infiltrado inflamatório crônico, atribuindo aos tecidos características de tecido linfóide organizado (KRATZ et al., 1996). Ainda, atua recrutando moléculas de adesão, como e-selectina, VCAM, ICAM, (CUFF et al., 1998; CUFF; SACCA; RUDDLE, 1999; HJELMSTRÖM et al., 2000) para o local da inflamação, ajudando na manutenção do processo inflamatório, favorecendo o desenvolvimento das lesões. A LT- α e o infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos T CD8⁺ pode ainda estar contribuindo para a perda de miocardiócitos por apoptose, fenômeno demonstrado em pacientes com CCC (TOSTES et al., 2005).

Houve diminuição da expressão de LT- α por linfócitos T CD4⁺ após a estimulação com antígenos de *T. cruzi*. Tal fato pode ser explicado pela existência de mecanismos imunorreguladores nesse tipo de célula (T CD4⁺).

Os linfócitos T CD8⁺ de pacientes com a forma indeterminada expressaram mais LT- α do que os linfócitos T CD4⁺, na ausência de estímulos e após estímulo com antígenos

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

cardíaca, expressaram mais LT- α do que após a estimulação antigênica, sugerindo que os mecanismos reguladores acontecem apenas nos pacientes com CCC.

A LT- α , produzida em maiores níveis por pacientes com CCC e com expressão predominante por linfócitos T CD8⁺, principal célula do infiltrado inflamatório desses pacientes, é um importante componente do sistema imunológico que pode colaborar com a manutenção e intensidade do processo inflamatório, com consequente lesão tecidual nesses indivíduos.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

- ❖ A presença dos genótipos GG e AG do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252, contribui para o desenvolvimento da forma cardíaca da doença de Chagas crônica, com risco de 2,8 e 2,4 vezes maior para os portadores, respectivamente, em relação aos portadores do genótipo AA.
- ❖ O alelo G foi mais frequente entre os indivíduos com a forma cardíaca da doença de Chagas crônica do que entre os indivíduos com a forma indeterminada. O risco de um indivíduo portador do alelo G desenvolver a forma cardíaca é 2,4 vezes maior do que um não portador.
- ❖ Níveis mais altos de LT- α são produzidos após 120 horas de cultura.
- ❖ Indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* produzem níveis mais altos de LT- α do que os soronegativos na presença de antígenos do parasito, após 48 horas de cultura. Em culturas de 120 horas, os indivíduos com sorologia positiva para *T. cruzi* apresentaram níveis basais mais altos do que os indivíduos soronegativos.
- ❖ Os indivíduos com a forma cardíaca da doença produziram níveis mais altos de LT- α do que os indivíduos com a forma indeterminada.
- ❖ Não houve diferenças na produção de LT- α entre os genótipos AA, AG e GG do polimorfismo no gene da LT- α , posição +252.
- ❖ Indivíduos soropositivos para *T. cruzi* e portadores do alelo G produziram níveis significativamente mais elevados de LT- α na ausência de estímulos.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

- ❖ Os linfócitos T CD8⁺ são os principais subtipos de linfócitos que expressam LT- α , sem estimulação antigênica ou após estímulo com antígenos de *T. cruzi*.
- ❖ A presença de antígeno de *T. cruzi* diminui a expressão de LT- α por linfócitos T CD4⁺, possivelmente pela presença de mecanismos reguladores presentes neste tipo celular.
- ❖ Em indivíduos com a forma indeterminada, sem estimulação ou com estimulação antigênica por *T. cruzi*, linfócitos T CD8⁺ expressaram mais LT- α do que os T CD4⁺.
- ❖ Nos indivíduos com a forma cardíaca, linfócitos T CD4⁺ não estimulados expressaram mais LT- α do que após estimulação antigênica por *T. cruzi*.
- ❖ A LT- α contribui para o desenvolvimento da forma cardíaca da doença de Chagas crônica, e seu polimorfismo, na posição +252, poderia ser um marcador útil para a evolução para essa forma crônica.

ABATH, F. G. C. Imunologia da doença de Chagas. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, v. 35, n. 7, p. 101-108, 1983.

ABE, K. et al. Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo. **Blood**, New York, v. 101, n. 4, p. 1477-1483, 2003.

ABEL, L. C. et al. T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. **Microbes Infect.**, Paris, v. 7, n. 11-12, p. 1184-1195, 2005.

ABEL, L. C. J. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Autoimmun.**, London, v. 17, n. 1, p. 99-108, 2001.

ABEL, L. C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Molecular mimicry between cardiac myosin and *Trypanosoma cruzi* antigen B13: identification of a B13-driven human T cell clone that recognizes cardiac myosin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 30, n. 11, p. 1305-1308, 1997.

ABEL, L.; DESSEIN, A. J. The impact of host genetics on susceptibility to human infectious disease. **Curr. Opin. Immunol.**, Philadelphia, v. 9, n. 4, p. 509-516, 1997.

ACOSTA, A. M.; SADIGURSKY, M.; SANTOS-BUCH, C. A. Anti-striated muscle antibody activity produced by *Trypanosoma cruzi*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v. 172, n. 3, p. 364-369, 1983.

AGGARWAL, B.; MOFFAT, B.; HARKINS, R. N. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. **J Biol Chem.**, Baltimore, v. 259, n. 1, p. 686-691, 1984.

AIELLO, V. D. et al. A possible role for complement in the pathogenesis of chronic chagasic cardiomyopathy. **J. Pathol.**, London, v. 197, n. 2, p. 224-229, 2002.

ALCAÏS, A. et al. Evidence for a major gene controlling susceptibility to tegumentary leishmaniasis in a recently exposed bolivian population. **Am. J. Hum. Genet.**, Baltimore, v. 61, n. 4, p. 968-979, 1997.

ALMEIDA, H. O. et al. Denervação e cardiopatia no chagásico crônico. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 43-47, 1987.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

ALMEIDA, H. O. et al. Inflamação associada a células musculares cardíacas parasitadas pelo *Trypanosoma cruzi*, em chagásicos crônicos. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 183-186, 1984.

ANDRADE, L. O. et al. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 100, n. 4, p. 269-275, 2002.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 3, n. 10, p. 819-823, 2005.

ANDRADE, Z. A. Anatomia patológica da doença de Chagas. **Rev. Goiana Med.**, Goiânia, v. 4, n. 2, p. 103-119, 1958.

ANDRADE, Z. A. Patogenia da doença de Chagas. Novos aspectos. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 255-260, 1982.

ANDRADE, Z.; LOPES, E. R.; PRATA, S. P. Alterações do sistema de condução do coração em chagásicos acometidos de morte repentina. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 48, n. 1, p. 5-9, 1987.

ANDREWS, J. S.; BERGER, A. E.; WARE, C. F. Characterization of the receptor for tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) on human T lymphocytes. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 144, n. 7, p. 2582-2591, 1990.

AÑEZ, N. et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **Am. J. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 60, n. 5, p. 726-732, 1999.

BACH-ELIAS, M. et al. Presence of autoantibodies against small nuclear ribonucleoprotein epitopes in Chagas patients sera. **Parasitol. Res.**, Berlin, V. 84, n. 10, p. 796-799, 1998.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 127-131, 1998.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. Miocardiopatia chagásica crônica: um exemplo de resposta TH-1 exarcebada? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 33, supl. II, p. 50-51, 2000.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

BALDING, J. et al. Cytokine gene polymorphisms. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 48, n. 5, p. 1408-1413, 2003.

BARRETTO, A. C. P. et al. Comparação entre as alterações histológicas da miocardiopatia da doença de Chagas e cardiomiopatia dilatada. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 79-83, 1989.

BARRETTO, A. C. P. et al. Forma indeterminada da doença de Chagas uma doença polimórfica. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 55, n. 6, p. 347-353, 1990.

BARROS, M. A. M. T. et al. *In Vitro* cellular immunity in Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 376-380, 1979.

BERAÚN, Y. et al. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 52, n. 1, p. 81-83, 1998.

BILATE, A. M. B. et al. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Microbes Infect.**, Paris, v. 9, n. 9, p. 1104-1113, 2007.

BILATE, A. M. B.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 67-74, 2008.

BITTENCOURT, A. L. Placentite chagásica e transmissão congênita da doença de Chagas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 62-67, 1963.

BONFA, E. et al. Autoantibodies in Chagas' disease. n antibody cross-reactive with human and *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 150, n. 9, p. 3917-3923, 1993.

BORDA, E. et al. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to β -adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 679-686, 1984.

BOSETTO, M. C. et al. Presence of autontibodies against Hela small nuclear ribonucleoproteins in chagasic and non-chagasic cardiac patients. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 37-45, 2004.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 82, supl. n. 205-213, 1987.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, New York, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997.

BROWNING, J.; RIBOLINO, A. Studies on the differing effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin on the growth of several human tumor lines. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 143, n. 6, p. 1859-1867, 1989.

BURGER, D.; JAMIESON, S. E.; BLACKWELL, J. M. Genetic susceptibility to infectious disease: big is beautiful (and will bigger be even better?). **Lancet Infect. Dis.**, New York, v. 6, n. 10, p. 653-663, 2006.

CALZADA, J. E. et al. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 58, n. 3, p. 154-158, 2001.

CALZADA, J. E. et al. Lack of association between NRAMP1 gene polymorphisms and *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 57, n. 4, p. 353-357, 2001.

CALZADA, J. E. et al. No evidence for association of the induzible nitric oxide synthase promoter polymorphism with *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 59, n. 4, p. 316-319, 2002.

CALZADA, J. E. et al. Transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) gene polymorphisms and Chagas disease susceptibility in Peruvian and Colombian patients. **Cytokine**, Philadelphia, v. 45, n. 3, p. 149-153, 2009.

CAMARGO, M. M. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiated the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 158, n. 12, p. 5890-5891, 1997.

CAMPELO, V. et al. TNF microsatellite alleles in Brazilian chagasic patients. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 52, n. 12, p. 3334-3339, 2007.

CARVALHAL, S. Considerações em torno da patogênese da moléstia de Chagas. Especial ênfase em relação à fase crônica. **AMB Rev. Ass. Med. Bras.**, São Paulo, v. 23, n. 4, 1977.

CASANOVA, J. L.; ABEL, L. Inborn errors of immunity to infection: the rule rather than the exception. **J. Exp. Med.**, New York, v. 202, n. 2, p. 197-201, 2005.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

CAVENDER, D. E.; EDELBAUM, D.; ZIFF, M. Endothelial cell activation induced by tumor necrosis factor and lymphotoxin. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 134, n. 3, p. 551-560, 1989.

CHAGAS, C. Nova entidade morbida do homem. Rezumo geral de estudos etiologicos e clinicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 219-275, 1911.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiasse humana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHAGAS, C. Processos patojenicos da tripanozomiasse americana. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 5-36, 1916.

CHAPADEIRO, E. et al. Incidência de “megas” associados à cardiopatia chagásica. **Rev. Inst. Trop.**, São Paulo, v. 6, n. 6, p. 287-291, 1964.

CLARK, K. et al. Lymphotoxin alpha and tumour necrosis factor are not required for control of parasite growth, but differentially regulate cytokine producing during *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 29, p. 153-158, 2007.

CLEMENTI, M.; GIANANTONIO, E. Genetic susceptibility to infectious disease. **Report. Toxicol.**, Elmsford, v. 21, n. 4, p. 345-349, 2006.

COLORADO, I. A . et al. HLA class II DRB1, DQB1, DPB1 polymorphism and cardiomyopathy due to *Trypanosoma cruzi* infection. **Hum. Immunol.**, New York, v. 61, n. 3, p. 320-325, 2000.

COSTA, R. P. et al. T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: differential frequencies of Vbeta5 expressing T cells. **Scand. J. Immunol.**, Oxford v. 51, n. 5, p. 511-519, 2000.

COURA, J. R. Chagas disease: what is know and what is needed- a background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, supl. I, p. 113-122, 2007.

CRUZ-ROBBES, D. et al. MHC class I and class III genes in Mexican patients with Chagas disease. **Hum. Immunol.**, New York, v. 65, n. 1, p. 60-65, 2004.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

CUFF, C. A. et al. Lymphotoxin alpha3 induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT alpha in inflammation and lymphoid organ development. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 161, n. 12, p. 6853-6860, 1998.

CUFF, C. A.; SACCA, R.; RUDDLE, N. H. Differential induction of adhesion molecule and chemokine expression by LT alpha3 and LT alpha beta in inflammation elucidates potential mechanisms of mesenteric and peripheral lymph node development. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 162, n. 10, p. 5965-5972, 1999.

CUNHA-NETO, E. et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 92, n. 8, p. 3541-3545, 1995.

CUNHA-NETO, E. et al. Autoimmunity in Chagas' disease. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 98, n. 8, p. 1709-1712, 1996.

CUNHA-NETO, E. et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 167, n. 2, p. 305-313, 2005.

CUNHA-NETO, E. et al. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 133-137, 1998.

CUNHA-NETO, E. et al. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. **Autoimmunity**, London, v. 39, n. 1, p. 41-54, 2006.

DE OLIVEIRA, S. F. et al. Sera from chronic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. **Circulation**, Dallas, v. 96, n. 6, p. 2031-2037, 1997.

DE SCHEERDER, I. K. et al. Anti-myosin humoral immune response following cardiac injury. **Autoimmunity**, London, v. 4, n. 1-2, p. 51-58, 1989.

DeFARIA, C. R.; REZENDE, J. M.; RASSI, A. Desnervação periférica nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas. **Arq. Neuropsiquiat.**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 225-236, 1988.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

DEGHAIDE, N. H.; DANTAS, R. O.; DONADI, E. A. HLA class I and II profiles of patients presenting with Chagas' disease. **Dig. Dis. Sci.**, New York, v. 43, n. 2, p. 246-252, 1998.

DESSEIN, A. J. et al. Genetic of parasitic infectious. **Drug Metab. Dispos.**, Bethesda, v. 29, n. 4, p. 484-488, 2001.

DESSEIN, A. J. et al. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon- γ receptor gene. **Am. J. Hum. Genet.**, Baltimore, v. 65, n. 3, p. 709-721, 1999.

DIAS, J. C. P. Acute Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, supl., p. 85-91, 1984.

DIAS, J. C. P. et al. Further evidence of spontaneous cure in human Chagas disease. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 505-506, 2008.

DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 147-156, 1989.

DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America- a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

DOSREIS, G. A. et al. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 237-243, 2005.

DRIGO, S. A. et al. Lack of association of tumor necrosis factor- α polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. **Immunol. Lett.**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 109-111, 2007.

DRIGO, S. A. et al. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. **Microbes Infect.**, Paris, v. 8, n. 3, p. 598-603, 2005.

DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, London, v. 21, n. 3, p. 287-292, 2008.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

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

ELIZARI, M. V. La miocardiopatía chagásica perspectiva histórica. **Medicina**, Buenos Aires, v. 59, supl. II, p. 25-40, 1999.

ENGMAN, D. M.; LEON, J. S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 123-132, 2002.

ENGWERDA, C. R. et al. Distinct roles for lymphotoxin- α and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 165, n. 6, p. 2123-2133, 2004.

ENGWERDA, C. R. et al. Locally up-regulated lymphotoxin α , not systemic tumor necrosis factor α , is the principle mediator of murine cerebral malaria. **J. Exp. Med.**, New York, v. 195, n. 10, p. 1371-1377, 2002.

FAÉ, K. C. et al. HLA and beta-myosin heavy chain do not influence susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy. **Microbes Infect.**, Paris, v. 2, n. 7, p. 745-751, 2000.

FERNANDEZ-MESTRE, M. T. et al. Influence of the HLA class II polymorphism in chronic Chagas' disease. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 197-203, 1998.

FERNÁNDEZ-MESTRE, M. T.; MONTAGNANI, S.; LAYRISSE, Z. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease? **Hum. Immunol.**, New York, v. 65, n. 7, p. 725-728, 2004.

FERRARI, I. et al. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human β 1-adrenergic receptor. **J. Exp. Med.**, New York, v. 182, n. 1, p. 59-65, 1995.

FERREIRA, R. C. et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor- α in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 407-411, 2003.

FLÓREZ, O. et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in Chagas disease in Colombian case-control study. **Hum. Immunol.**, New York, v. 67, n. 9, p. 741-748, 2006.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

FONSECA, S. G. et al. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. **Microbes Infect.**, Paris, v. 7, n. 4, p. 688-697, 2005.

FREITAS, J. M. et al. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 411-417, 2004.

FRODSHAM, A. J.; HILL, A. V. S. Genetic of infectious diseases. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 187-194, 2004.

FU, Y. X. et al. B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell cluster in a lymphotoxin α -dependent fashion. **J. Exp. Med.**, New York, v. 187, n. 7, p. 1009-1018, 1998.

FU, Y. X. et al. Lymphotoxin- α (LT α) supports development of splenic follicular structure that is required for IgG responses. **J. Exp. Med.**, New York, v. 185, n. 12, p. 2111-2120, 1997.

FU, Y. X.; CHAPLIN, D. D. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. **Annu. Rev. Immunol.**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 399-433, 1999.

GARROTE, J. A. et al. TNF α and LT α gene polymorphisms as additional markers of celiac disease susceptibility in a DQ2-positive population. **Immunogenetics**, New York, v. 54, n. 8, p. 551-555, 2002.

GEA, S. et al. Chagas' disease cardiomyopathy: association of anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-sciatic nerve antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 49, n. 5, p. 581-588, 1993.

GIORDANENGO, L. et al. Anti-galectin-1 autoantibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection: differential expression of this β -galactoside-binding protein in cardiac Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 124, n. 2, p. 266-273, 2001.

GIRONÈS, N. et al. Antibodies to an epitope from the Cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 8, n. 6, p. 1039-1043, 2001.

GIRONÈS, N. et al. Dominant T- and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 107, n. 8, p. 985-993, 2001.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 19-22, 2003.

GOIN, J. C. et al. Distribution of antibodies against beta-adrenoceptors in the course of human *Trypanosoma cruzi* infection. **Proc Soc Exp Biol Med**, Malden, v. 197, n. 2, p. 186-192, 1991.

GOIN, J. C. et al. Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. **FASEB J.**, Bethesda, v. 10, n. 1, p. 77-83, 1997.

GOIN, J. C. et al. Modification of cholinergic-mediated cellular transmembrane signals by the interaction of human chagasic IgG with cardiac muscarinic receptors. **Neuroimmunomodulation**, Basel, v. 1, n. 5, p. 284-291, 1994.

GOLUSZKO, E. et al. Lymphotoxin-alpha deficiency completely protects C57BL/6 mice from developing clinical experimental autoimmune myasthenia gravis. **J Neuroimmunol.**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 109-118, 2001.

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.

GONG, M. N. et al. -308GA and TNFB polymorphisms in acute respiratory distress syndrome. **Eur. Respir. J.**, Copenhagen, v. 26, n. 3, p. 382-389, 2005.

GOYAL, A. et al. Association of TNF- β polymorphism with disease severity among patients infected with hepatitis C virus. **J. Med. Virol.**, New York, v. 72, n. 1, p. 60-65, 2004.

GRANGER, G. A.; WILLIAM, T. W. Lymphocyte cytotoxicity in vitro: activation and release of cytotoxic factor. **Nature**, London, v. 218, n. 5148, p. 1253-1254, 1968.

GRAY, P. W. et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. **Nature**, London, v. 312, n. 5996, p. 721-741, 1984.

GUERRA, H. A. et al. Clinical, histochemical, and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. **Am. Heart J.**, St. Louis, v. 113, n. 3, p. 716-724, 1987.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

HASHIMOTO, T.; SCHLESSINGER, D.; CUI, C. Y. Troy binding to lymphotoxin- α activates NK κ B mediated transcription. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 7, n. 1, p. 106-111, 2008.

HEIKENWALDER, M. et al. Overexpression of lymphotoxin in T cells induces fulminant thymic involution. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 172, n. 6, p. 1555-1569, 2008.

HIGUCHI, M. L. et al. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 56, n. 5, p. 485-489, 1997.

HIGUCHI, M. L. et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. **Clin. Cardiol.**, New York, v. 10, n. 11, p. 665-670, 1987.

HJELMSTRÖM, P. et al. Lymphoid tissue homing chemokines are expressed in chronic inflammation. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 156, n. 4, p. 1133-1138, 2000.

I REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS. Validade do conceito de forma indeterminada de doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 18, p. 46, 1985.

IWAI, L. K. et al. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. **J. Autoimmun.**, London, v. 24, n. 2, p. 111-117, 2005.

JONES, E. M. et al. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 48, n. 3, p. 348-357, 1993.

JUN, T. Y. et al. TNFB polymorphism may be associated with schizophrenia in the Korean population. **Schizophr. Res.**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 39-45, 2003.

KAPLAN, D. et al. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 94, n. 19, p. 10301-10306, 1997.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

KERNER, N. et al. *Trypanosoma cruzi*: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-reacted with mammalian cytoskeleton. **Exp. Parasitol.**, Orlando, v. 73, n. 4, p. 451-459, 1991.

KESO, T. et al. Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 154, n. 3, p. 691-697, 2001.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 12, n. 2, p. 210-223, 1999.

KIM, T. G. et al. Systemic lupus erythematosus with nephritis is strongly associated with the TNFB*2 homozygote in the Korean population. **Hum. Immunol.**, New York, v. 46, n. 1, p. 10-17, 1996.

KIRCHOHOFF, L. V. et al. Parasitic diseases of the heart. **Front. Biosci.**, Tampa, v. 1, n. 9, p. 706-723, 2004.

KOCH, W. et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 137-144, 2001.

KÖEBERLE, F. Patogenia da moléstia de Chagas: estudos dos órgãos musculares ôcos. **Rev. Goiana Med.**, Goiânia, v. 3, n. 3, p. 155-180, 1957.

KRASSNER, S. M. et al. In vitro release of lymphotoxin by spleen cells from C3H/HEJ and C57BL/6 mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 31, n. 6, p. 1080-1089, 1982.

KRATZ, A. et al. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. **J. Exp. Med.**, New York, v. 183, n. 4, p. 1461-1472, 1996.

KUPRASH, D. V. et al. Redundancy in tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) signaling in vivo: mice with inactivation of the entire TNF/LT locus versus single-knockout mice. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 22, n. 24, p. 8626-8634, 2002.

LANNES-VIEIRA, J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8⁺ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 299-304, 2003.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

LARANJA, F. S. et al. Chagas' disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, Dallas, v. 14, n. 6, p. 1035-1060, 1956.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 2, p. 473-529, 1948.

LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. **Front. Biosci.**, Tampa, v. 1, n. 8, p. 315-322, 2003.

LEVIN, M. J. et al. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 41, n. 5, p. 530-538, 1989.

LEVITUS, G. et al. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 85, n. 3, p. 413-417, 1991.

LIEPINS, D. J. et al. Novel lymphotoxin alpha (LT α) knockout mice with unperturbed tumor necrosis factor expression: reassessing LT α biological functions. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 26, n. 11, p. 4214-4225, 2006.

LOPES, E. R. et al. Anatomia patológica de corações de chagásicos assintomáticos falecidos de modo violento. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 2, p. 189-197, 1981.

LOPES, E. R. et al. Contribuição ao estudo da anatomia patológica dos corações de chagásicos falecidos subitamente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 9, n. 6, p. 269-282, 1975.

MACEDO, A. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 1-12, 2004.

MACKAY, F. et al. Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 27, n. 8, p. 2033-2042, 1997.

MAGEZ, S. et al. Control of experimental *Trypanosoma brucei* infections occurs independently of lymphotoxin- α induction. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 70, n. 3, p. 1342-1351, 2002.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

MAKHATADZE, N. J. Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. **Hum. Immunol.**, New York, v. 59, n. 9, p. 571-579, 1998.

MARIN-NETO, J. A. et al. Cardiac autonomic impairment and early myocardial damage involving the right ventricle are independent phenomena in Chagas' disease. **Int. J. Cardiol.**, Amsterdam, v. 65, n. 3, p. 261-269, 1998.

MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*, Dallas, v. 115, n. 9, p. 1109-1123, 2007.

MARQUET, S. et al. Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. **Nat. Genet.**, New York, v. 14, n. 2, p. 181-184, 1996.

McCORMICK, T. S.; ROWLAND, E. C. Trypanosoma cruzi: recognition of 43-kDa muscle glycoprotein by autoantibodies present during murine infection. **Exp. Parasitol.**, Orlando, v. 77, n. 3, p. 273-281, 1993.

MEDDEB-GARNAOUI, A. et al. Association analysis of HLA-Class II and Class III gene polymorphisms in the susceptibility to Mediterranean visceral leishmaniasis. **Hum. Immunol.**, New York, v. 62, n. 5, p. 509-517, 2001.

MELANI, C. et al. Lymphotoxin gene expression by melanocytes and melanoma cell lines and persistence of unspliced mRNA. **FEBS J.**, Oxford, v. 335, n. 1, p. 114-118, 1993.

MELLO, A.; MELLO, N. R. A forma nervosa crônica da doença de Chagas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 15, p. 194-222, 1955.

MESSER, G. et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. **J. Exp. Med.**, New York, v. 173, n. 1, p. 209-219, 1991.

MESSIAS-REASON, I. J.; URBANETZ, L., PEREIRA DA CUNHA, C. Complement C3 F and BF S haplotypes are risk factors for Chagas disease cardiomyopathy. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 62, n. 4, p. 308-312, 2003.

MILLET, I.; RUDDLE, N. H. Differential regulation of lymphotoxin (LT), lymphotoxin- β (LT- β), and TNF- α in murine T cell clones activated through the TCR. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 152, n. 9, p. 4336-4346, 1994.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

MIZUNO, H. et al. Impact of atherosclerosis-related gene polymorphisms on mortality and recurrent events after myocardial infarction. **Artherosclerosis**, Amsterdam, v. 185, n. 2, p. 400-405, 2006.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 577, 2003.

MURPHY, P. M. Molecular mimicry and the generation of host defense protein diversity. **Cell**, Cambridge, v. 72, n. 6, p. 823-826, 1993.

NEDOSPASOV, S. A. et al. Tandem arrangement of genes coding for tumor necrosis factor (TNF- α) and lymphotoxin (TNF- β) in the human genome. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, New York, v. 51, n. 1, p. 611-624, 1986.

NEDWIN, G. E. et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes structure, homology and chromosomal localization. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 13, n. 17, p. 6361-6373, 1985.

NIETO, A. et al. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 55, n. 3, p. 195-198, 2000.

NIETO, A. et al. HLA haplotypes are associated with differential susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 55, n. 3, p. 195-198, 2000.

NITZ, N. et al. Heritable integration of kDNA minicircle sequence from *Trypanosoma cruzi* into the avian genome: insights into human Chagas disease. **Cell**, Cambridge, v. 118, n. 2, p. 175-186, 2004.

NIWA, Y. et al. Lymphotoxina-alpha polymorphisms and the risk of endometrial cancer in Japanese subjects. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 104, n. 3, p. 586-590, 2007.

NOMURA, Y. et al. Relationship between the degree of injury at operation and the change in antimyosin antibody titer in the postpericardiotomy syndrome. **Pediatr. Cardiol.**, New York, v. 15, n. 3, p. 116-120, 1994.

OZAKI, K. et al. Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. **Nat Genet.**, New York, v. 32, n. 4, p. 650-654, 2002.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

OZAKI, K. et al. Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin- α secretion *in vitro*. *Nature*, London, v. 429, n. 6987, p. 72-75, 2004.

PALOMINO, S. A. P.; AIELLO, V. D.; HIGUCHI, M. L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v. 94, n. 6, p. 571-579, 2000.

PASCUAL, J.; BORDA, E.; STERIN-BORDA, L. Chagasic IgG modifies the activity of sarcolemmal ATPases through a beta adrenergic mechanism. **Life Sci.**, Oxford, v. 26, n. 40, p. 313-319, 1987.

PETRY, K.; EISEN, H. Chagas disease: a model for the study of autoimmune diseases. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 11-121, 1989.

PICARD, C.; CASANOVA, J. L.; ABEL, L. Mendelian traits that confer predisposition or resistance to specific infectious in humans. **Curr. Opin. Immunol.**, Philadelphia, v. 18, n. 4, p. 383-390, 2006.

PITTELLA, J. E. H. O envolvimento do sistema nervoso central na forma crônica da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 291-292, 1996.

POBER, J. S. et al. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 138, n. 10, p. 3319-3324, 1987.

PORTO, C. C.; PORTO, C. O eletrocardiograma na forma digestiva da moléstia de Chagas. **Rev. Goiana Med.**, Goiânia, v. 5, p. 229-239, 1959.

PRADO, A. A. Aspectos patológicos gerais da doença de Chagas. Congr. Internac. Sobre a doença de Chagas. Rio de Janeiro, 1959.

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

PRATA, A.; MACÊDO, V. Morbidity of Chagas' heart disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, supl., p. 93-96, 1984.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

QUINTANA-MURCI, L. et al. Immunology *in natura*: clinical, epidemiological and evolutionary genetics of infectious diseases. **Nat. Immunol.**, New York, v. 8, n. 11, p. 1165-1171, 2007.

RAMASAWMY, R. et al. BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 193, n. 10, p. 1394-1399, 2006.

RAMASAWMY, R. et al. Polymorphisms in the gene for lymphotoxin- α predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 196, n. 12, p. 1836-1843, 2007.

RAMASAWMY, R. et al. The monocyte chemoattractant proteina-1 gene polymorphism is associated with cardiomyopathy in human Chagas disease. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 43, n. 3, p. 305-311, 2006.

RAMASAWMY, R. et al. Variants in the promoter region of IKBL/NFKBIL1 gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi*-infected individuals. **Mol. Immunol.**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 283-288, 2008.

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α ⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 637-644, 1993.

REIS, D. D. et al. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 49, n. 2, p. 192-200, 1993.

REIS, M. M. et al. An *in situ* quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R⁺ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, New York, v. 83, n. 2, p. 165-172, 1997.

REZENDE, J. M. Forma digestiva da moléstia de Chagas. **Rev. Goiana Med.**, Goiânia, v. 5, p. 193-227, 1959.

RIBEIRO DOS SANTOS, R. et al. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. **Tropenmed Parasitol**, Stuttgart, v. 30, n. 1, p. 19-23, 1979.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

ROACH, D. R. et al. Secreted lymphotoxin- α is essential for the control of an intracellular bacterial infection. **J. Exp. Med.**, New York, v. 193, n. 2, p. 239-246, 2001.

RODRIGUES, V. et al. Fas/Fas-L expression, apoptosis and low proliferative response are associated with heart failure in patients with chronic Chagas' disease. **Microbes Infect.**, Paris, v. 10, n. 11-12, p. 29-37, 2008.

RODRIGUES, V. et al. Genetic control of Schistosome infections by the SM1 locus of the 5q31-33 region is linked to differentiation of type 2 helper T lymphocytes. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 67, n. 9, p. 4689-4692, 1999.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, J. M. et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. **Immunol. Lett.**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 97-102, 2005.

RUSE, C. E. et al. Tumour necrosis factor gene complex polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. **Respir. Med.**, London, v. 101, n. 2, p. 340-344, 2007.

SACCA, R. et al. Differential activities of secreted lymphotoxin-alpha3 and membrane lymphotoxin-alpha1beta2 in lymphotoxin-induced inflammation: critical role of TNF receptor 1 signaling. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 160, n. 1, p. 485-491, 1998.

SANTOS-BUCH, C. A. et al. Primary muscle disease: definition of a 25-kDa polypeptide myopathic specific Chagas antigen. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, New York, v. 37, n. 3, p. 334-350, 1985.

SCHLÜTER, D. et al. Both lymphotoxin- α and TNF are crucial for control of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 170, n. 12, p. 6172-6182, 2003.

SEGAL, S.; HILL, A. V. S. Genetic susceptibility to infectious disease. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 11, n. 9, p. 445-448, 2003.

SHALABY, M. R. et al. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon- γ and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 135, n. 3, p. 2069-2073, 1985.

SOARES, M. B. P.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, suppl. 1, p. 257-262, 1999.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

SONG, Y. et al. Correlation between a gene polymorphism of tumor necrosis factor and inflammatory bowel disease. **Chin J Dig Dis**, Carlton South, v. 6, n. 4, p. 170-174, 2005.

SOUZA, P. E. A. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 72, n. 9, p. 5283-5291, 2004.

STANULLA, M. et al. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genetic polymorphisms and risk of relapse in childhood B-cell precursors acute lymphoblastic leukemia: a case-control study of patients treated with BFM therapy. **BMC Blood Disord.**, London, v. 1, n. 1, p. 2, 2001.

STERIN-BORDA, L.; GORELIK, G.; BORDA, E. S. Chagasic IgG binding with cardiac muscarinic cholinergic receptors modifies cholinergic-mediated cellular transmembrane signals. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, Orlando, v. 61, n. 3, p. 387-397, 1991.

STERIN-BRODA, L. et al. Antibodies to $\beta 1$ and $\beta 2$ adrenoreceptors in Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 74, n. 3, p. 349-354, 1988.

SUNEETHA, P. V. et al. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF- α and TNF- β gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 44, n. 5, p. 856-863, 2006.

TAKEUCHI, F. et al. Genetic contribution of the tumour necrosis factor (TNF) B +252* 2/2 genotype, but not the TNF α , b microsatellite alleles, to systemic lupus erythematosus in Japanese patients. **Int. J. Immunogenet.**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 173-178, 2005.

TANOWITZ, H. B. et al. Chagas' disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 5, n. 4, p. 400-419, 1992.

TARLETON, R. L. Chagas disease: a role for autoimmunity? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 447-451, 2003.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitol Today**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 94-99, 1999.

TEIXEIRA, A. R. et al. *Trypanosoma cruzi*-sensitized T-lymphocyte mediated 51CR released from human heart cells in Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 27, n. 6, p. 1097-1107, 1978.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease- a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 05, p. 463-491, 2006.

TEKIEL, V. S.; MIRKIN, G. A.; GONZALEZ CAPPA, S. M. Chagas' disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, London, v. 115, n. 5, p. 495-502, 1997.

TIBBETTS, R. S. et al. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 152, n. 3, p. 1493-1499, 1994.

TOGNI, P. et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. **Science**, Washington, v. 264, n. 5159, p. 703-707, 1994.

TOSTES, S. JR. et al. Myocardiocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. **Int. J. Cardiol.**, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 233-237, 2005.

TROWSDALE, J. Genomic structure and function in the MHC. **Trends Genet.**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 117-122, 1993.

VAGO, A. R. et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 156, n. 5, p. 1805-1809, 2000.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annu. Rev. Immunol.**, Oxford, v. 10, p. 411-452, 1992.

VERMELHO, A. B. et al. Heart muscle cells share common neutral glycosphingolipids with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**, Amsterdam, v. 64, n. 3-4, p. 131-143, 1997.

WACKERMANN, P. V. et al. Involvement of the central nervous system in the chronic form of Chagas disease. **J. Neurol. Sci.**, Amsterdam, v. 269, n. 1-2, p. 152-157, 2008.

WANG, T. N. et al. Gene-gene synergistic effect on atopic asthma: tumour necrosis factor- α -308 and lymphotoxin- α -NcoI in Taiwan's children. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 184-188, 2004.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

WARE, C. F. et al. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. **Curr Top Microbiol Immunol.**, Berlin, v. 198, n. 1, p. 175-218, 1995.

WARE, C. F. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. **Annu Rev Immunol.**, Palo Alto, v. 23, n. 1, p. 787-819, 2005.

WARZOCHA, K. et al. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. **Blood**, New York, v. 91, n. 10, p. 3574-3581, 1998.

WEISS, K. M.; TERWILLIGER, J. D. How many diseases does it take to map a gene with SNPs? **Nat. Genet.**, New York, v. 26, n. 2, p. 151- 157, 2000.

WONG, G. H. W.; GOEDEL, D. V. Tumor necrosis factor α and β inhibit virus replication and synergize with interferons. **Nature**, London, v. 323, n. 6091, p. 819-822, 1986.

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

ZAFRA, G. et al. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 1, p. 27-30, 2008.

ZAMMITI, W. et al. Tumor necrosis factor α and lymphotoxin- α haplotypes in idiopathic recurrent pregnancy loss. **Fertil. Steril.**, New York, 2008. In press.

ZICKER, F. et al. Physical activity, opportunity for reinfection, and sibling history of heart disease as risk factors for Chagas' cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 43, n. 5, p. 498-505, 1990.

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, simply open the document you want to convert, click "print", select the "Broadgun pdfMachine printer" and that's it! Get yours now!

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](#)