



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Amanda Priscila de Oliveira

Polimorfismos do receptor para quimiocinas
(DARC) na infecção por *Trypanosoma cruzi*:
avaliação na presença e ausência de Cardiopatia
Chagásica Crônica

São José do Rio Preto
2011

Amanda Priscila de Oliveira

**Polimorfismos do receptor para quimiocinas
(DARC) na infecção por *Trypanosoma cruzi*:
avaliação na presença e ausência de Cardiopatia
Chagásica Crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso
de Pós-graduação em Ciências da Saúde,
Área de Concentração: Medicina e
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavalini

**São José do Rio Preto
2011**

Oliveira, Amanda Priscila

“Polimorfismos do receptor para quimiocinas (DARC) na infecção por *Trypanosoma cruzi*: avaliação na presença e ausência de Cardiopatia Chagásica Crônica”.

São José do Rio Preto, 2011.

84 p

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini

1. Doença de Chagas; 2. Cardiopatia Chagásica Crônica; 3. DARC; 4. Quimiocinas.

AMANDA PRISCILA DE OLIVEIRA

Polimorfismos do receptor para quimiocinas
(DARC) na infecção por *Trypanosoma cruzi*:
avaliação na presença e ausência de Cardiopatia
Chagásica Crônica

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos E. Cavasini

1º Examinador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

2º Examinador: Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de
Azeredo Oliveira

1º Suplente: Prof. Dr. Ricardo Luiz D. Machado

2º Suplente: Lilian Castiglione

São José do Rio Preto, 21/07/2011.

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	iv
Epígrafe.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	ix
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	01
1.2. Objetivos.....	12
2. Artigos Científicos.....	13
Artigo 1. Chagas disease and Duffy antigen/receptor for chemokine (DARC): a mini-review.....	15
Artigo 2. DARC na Doença de Chagas: avaliação na presença e ausência de Cardiopatía Chagásica Crônica.....	37
3. Conclusões.....	66
4. Referências Bibliográficas.....	68
5. Apêndices.....	78
Apêndice 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	79
Apêndice 2. Ficha epidemiológica.....	80
6. Anexos.....	82
Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	83

Dedicatória

É com muito carinho e muita alegria que dedico este trabalho:

À Deus

Acima de tudo. Por estar sempre presente em minha vida, pelo amparo e auxílio. Pela força nos momentos de desânimo, principalmente para continuar caminhando. E também, ao meu anjo guardião, pelo amor incondicional, cuidado e condução em todos os momentos de minha vida.

À minha mãe Sueli

Presente em todos os momentos de minha vida. Pelo exemplo de mãe e mulher. Por me ensinar que a melhor estrada é sempre aquela que conduz ao bem. Pela dedicação, cuidado e carinho dirigidos a mim. Com sua sabedoria, ensinou-me que as dificuldades passam e são imprescindíveis para o crescimento pessoal. Quero agradecer por todos os ensinamentos, todas as virtudes, pela minha vida, pelo amor incondicional e por tudo que você renunciou e sempre fez por mim. Eu a amo muito.

Ao meu pai Hélcio

Por ter me acolhido como filha e fazer parte da minha vida. A convivência nos ensinou a aprender com as diferenças e permitiu-me perceber o quanto você é especial. Exemplo de honestidade. Obrigada pelo carinho, cuidado, apoio e pelo incentivo para continuar sempre lutando e não desistir dos meus sonhos.

Ao meu pai Astolfo

Os acontecimentos permitiram-me compreender o seu jeito de ser e também a admirá-lo. Exemplo de bondade. Saiba que mesmo longe estamos unidos pelo sentimento. Quero agradecer-lo pelo carinho e simplesmente por ser meu pai.

Aos meus irmãos

Aos meus irmãos de coração, a Aline e ao Wellington, os quais me ensinaram que os verdadeiros laços são os do sentimento. Pela convivência, tolerância e compreensão. E também por fazerem parte da minha vida. As minhas irmãzinhas Júlia e Rafaela por alegrarem a minha vida e serem como estrelas, enchendo-nos de luz.

Ao meu namorado Flávio

Por estar ao meu lado sempre e principalmente nas horas em que mais preciso. Com sua forma de ser admirável, sobretudo pelos valores pessoais e sabedoria, sempre procura me mostrar o lado bom dos acontecimentos e me faz acreditar que sou capaz. Quero lhe agradecer pelo carinho, paciência, compreensão e por fazer parte da minha vida. Amo você.

À minha Avó Tereza

É difícil escolher o que dizer de uma pessoa tão especial. Simplesmente exemplo de vida e sabedoria. Só tenho mesmo é que agradecer por tudo que a senhora sempre fez por mim, pelo amor incondicional, por todos os ensinamentos e principalmente por ser bem mais que uma avó, sendo fundamental na minha vida. Eu a amo muito.

À minha tia Terezinha

Gestos de carinho, atenção e solidariedade permitiram-me perceber o quanto você é especial. Desde que nasci você esteve sempre ali, pronta para o que fosse preciso. Quero agradecer-lá pela presença constante em minha vida, por estar sempre disposta a ajudar quando preciso, pelo incentivo, apoio e por acreditar no meu potencial. Obrigada por tudo e saiba que você é muito importante na minha vida.

À toda a minha família

A minha avó Geni e meu avô Astolfo pelo carinho e por acreditarem no meu potencial. Ao meu tio José Antônio, meu tio Aparecido, minha tia Bela, minha tia Lourdes e meu primo Ednaldo por estarem sempre presentes, compartilhando os momentos especiais. A minha priminha Maria Eduarda por ser tão especial e alegrar as nossas vidas. Ao Thalys que com sua simplicidade e seu jeito de ser conquistou a todos e ao Augusto por também fazer parte de nossas vidas. Enfim, quero agradecer a Andresa, ao Ed Carlos, a Juliana, a dona Geni e a todos os meus familiares pelo apoio e por me incentivarem a realizar os meus sonhos.

Aos meus amigos

A todos os meus amigos que acreditaram no meu potencial e me incentivaram, fortalecendo-me para continuar caminhando. Quero agradecer a todos aqueles que enxugaram as minhas lágrimas e sorriram comigo durante a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Acredito que ninguém realiza nada sozinho e durante o desenvolvimento deste trabalho contei com o auxílio e apoio de muitas pessoas, que gostaria de agradecer:

Ao Diretor Geral Prof. Dr. Humberto Liedtke Junior

Por realizar o seu trabalho com dignidade e pelo incentivo à pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FAMERP e aos funcionários

Pela atenção e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho. Quero agradecer também ao Seu João e às funcionárias da limpeza por exercerem suas atividades com dignidade e por alegrar o nosso dia.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini

Pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por todos os ensinamentos. Pelo apoio, paciência e compreensão. Além de sempre ter acreditado no meu potencial: muito obrigada.

Aos demais integrantes do projeto

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos pelo auxílio quando foi necessário. Ao Prof. Dr. Reynaldo Bestetti pela colaboração na triagem dos pacientes e pela médica Rudiane Vicentine por ter contribuído durante a coleta das amostras.

Ao Laboratório CIM

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado pela atenção, carinho e incentivo durante esta jornada. À Luciana e Valéria sempre dispostas a ajudar no que fosse preciso e mais do que isso, amigas de todas as horas. Ao Gustavo sempre pronto para auxiliar,

independente do que estivesse fazendo. Por esclarecer todas as minhas dúvidas, seja da teoria, da prática ou na tradução de um artigo. Quero agradecer a Cecília, ao Marcus, a Marcela e também a todos os alunos que passaram pelo laboratório durante o desenvolvimento do meu projeto, pela convivência e compreensão.

Ao Laboratório UPGEM

A Profa. Dra. Enny Goloni Bertollo e a Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino Bertelli pela atenção e por todos os ensinamentos. A todos os alunos do laboratório, e principalmente à Anelise, Joice, Patrícia, Ana Livia, Gláucia, Tatiane, Gustavo e Rodrigo, pela amizade e por esclarecerem as minhas dúvidas sempre que necessário.

Ao CNPq

Pela bolsa concedida.

Ao Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital de Base

Ao Dr. Reynaldo Bestetti e aos funcionários que colaboraram na obtenção das amostras.

Aos pacientes do ambulatório

Por terem consentido em participar da pesquisa e por acreditarem no desenvolvimento científico.

Aos membros da banca examinadora

Pelo carinho, atenção e disponibilidade na contribuição para finalização deste trabalho.

Enfim, quero agradecer todas as pessoas, que de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

Epígrafe

“Deus nos concede a cada dia uma página de vida nova no livro do tempo. Não se pode voltar atrás, no entanto é possível recomeçar e construir um novo fim. A maturidade permite-me olhar com menos ilusões, aceitar com menos sofrimento, entender com mais tranqüilidade, querer com mais doçura.

A totalidade pessoal só é atingida de uma forma: conhecer-se a si mesmo ao máximo, aceitar-se e superar-se, sendo completo quem tem a si mesmo. No entanto, há coisas que só o coração pode entender. Fundamental é mesmo o amor, impossível é ser feliz sozinho.”

Lista de Figuras:

<i>Introdução</i>	Figura1. Ciclo de vida do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
-------------------	---	---

Lista de tabelas

- Artigo 2*
- Tabela 1.** Frequências genotípicas e alélicas de *FY* em 63 pacientes com CCC e indivíduos sem manifestações cardíacas, atendidos no ambulatório de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital de Base – FUNFARME.
- Tabela 2.** Frequências genotípicas de *FY* entre os diferentes 64 graus de severidade da CCC dos pacientes atendidos no ambulatório de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital de Base – FUNFARME.
- Tabela 3.** Frequências dos graus de severidade da CCC entre 65 os pacientes com faixas etárias menor ou igual a 60 e maior que 60 anos de idade atendidos no ambulatório de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital de Base – FUNFARME.
- Tabela 4.** Dados demográficos e frequência de DARC nos 65 cardiopatas e sororreagentes para o T. cruzi.

Lista de abreviaturas e símbolos

A	Adenina
B 13	Proteína recombinante do <i>T. cruzi</i>
CC	β -quimiocinas
CCC	Cardiopatia Chagásica Crônica
CCL11/Eotaxin	<i>CC chemokine ligand 11/Eotaxin</i>
CCL13/MCP-4	<i>CC chemokine ligand 13/ Monocyte Chemotactic Protein-4</i>
CCL14/HCC-1	<i>CC chemokine ligand 14/ Hemofiltrate CC-Chemokine-1</i>
CCL17/TARC	<i>CC chemokine ligand 17/Thymus and Activation Regulated Chemokine</i>
CCL2/MCP-1	<i>CC chemokine ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
CCL3/ MIP-1 α	<i>CC chemokine ligand 3/Macrophage Inflammatory Protein-1-alpha</i>
CCL4/MIP-1 β	<i>CC chemokine ligand 4/ Macrophage Inflammatory Protein-1-beta</i>
CCL5/RANTES	<i>CC chemokine ligand 5/Regulated Upon Activation Normal T-cell Expressed, and Presumably Secreted</i>
CCL7/MCP-3	<i>CC chemokine ligand 7/Monocyte Chemoattractant Protein-3</i>
CCL8/MCP-2	<i>CC chemokine ligand 8/Monocyte Chemoattractant Protein-2</i>
CEP	Comitê de ética em Pesquisa (<i>Research Ethics Committee</i>)
CI 95%	<i>Confidence interval</i>
CIM	Centro de Investigação de Microorganismos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CXC	α -quimiocinas
CXCL1/GRO α	CXC chemokine ligand 1/ <i>Growth Related Oncogene alpha</i>
CXCL10/IP-10	CXC chemokine ligand 10/ <i>Interferon-inducible protein-10</i>
CXCL11/I-TAC	CXC chemokine ligand 11/ <i>Interferon-Inducible T-cell Alpha Chemoattractant</i>
CXCL2 /GRO β	CXC chemokine ligand 2/ <i>Growth Regulated Oncogene beta</i>
CXCL3/GRO γ	CXC chemokine ligand 1/ <i>Growth Regulated Oncogene gamma</i>
CXCL4 /PF4	CXC chemokine ligand 4/ <i>Platelet Factor-4</i>
CXCL5/ENA-78	CXC chemokine ligand 5/ <i>Epithelial Neutrophil-Activating Protein-78</i>
CXCL6/GCP-2	CXC chemokine ligand 6/ <i>Granulocyte Chemoattractant Protein-2</i>
CXCL7/NAP-2	CXC chemokine ligand 7/ <i>Neutrophil-Activating Protein-2</i>
CXCL8/IL-8	CXC chemokine ligand 8/ <i>Interleukin-8</i>
DARC	<i>Duffy Antigen/ Receptor for Chemokine</i>
DNA	Ácido Dexoxirribonucléico (<i>Desoxirribonucleic acid</i>)
ELISA	Teste Imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (<i>São José do Rio Preto Medical School</i>)
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
FY	Gene Duffy
Fy	Antígeno Duffy

G	Guanina
GATA-box	Região Promotora do Gene Duffy
gp-Fy	glicoproteína Duffy
HB	Hospital de Base
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IFN- γ	Interferon-gama (<i>Interferon-gamma</i>)
IL-12	<i>Interleukin-12</i>
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível (<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	<i>Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta (<i>Indirect Immunofluorescence Reaction</i>)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa (<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>)
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular

Resumo

Introdução: Os antígenos do sistema histo-sanguíneo Duffy, glicoproteínas transmembrânicas moderadamente imunogênicas, codificadas pelos alelos *FYA* e *FYB*, foram identificados receptores para quimiocinas e, por isso, denominadas DARC (Duffy Antigen/ Receptor for Chemokine). Já foi comprovada a ligação deste receptor com 16 quimiocinas inflamatórias. O antígeno Duffy pode estar envolvido na “varredura” do excesso destes mediadores inflamatórios dos locais de inflamação, e, possivelmente, atenuando os danos causados por esta produção exacerbada. As quimiocinas inflamatórias desempenham importante papel na regulação da resposta imune, no entanto quando produzidas em excesso podem contribuir para lesões teciduais observadas na Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC), que é forma mais prevalente da doença de Chagas. Esta doença é o resultado de um processo inflamatório, uma vez que uma das características patológicas é a presença de um grande número de células inflamatórias no miocárdio, sendo caracterizada pela presença de miocardite difusa com um processo de intensa remodelação miocárdica, fibrose, hipertrofia e lesão das fibras musculares cardíacas. Experimentos realizados com algumas quimiocinas e a CCC mostraram que níveis plasmáticos elevados destes mediadores inflamatórios foram associados com a gravidade da doença nestes pacientes. E ainda, a produção local de quimiocinas pode desempenhar uma função de grande importância nos danos cardíacos observados na CCC. **Objetivos:** Determinar se há diferenças no perfil genotípico de DARC entre indivíduos sororreagentes para *T. cruzi*, com e sem CCC e, nos últimos, verificar se há associação dos genótipos destes pacientes com os graus de severidade da doença, além de investigar se existe associação entre o sexo e idade dos indivíduos e a CCC. **Casuística e Métodos:** Foram incluídos no estudo 95 indivíduos, sendo 74

pacientes, os quais apresentavam a forma clínica de Cardiopatia Chagásica Crônica, e, 21 indivíduos sem manifestações cardíacas detectáveis. A análise molecular foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismos de Comprimentos de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP). Os dados foram avaliados por Regressão Logística Múltipla e os testes Qui-quadrado ou exato de Fisher. **Resultados:** Nossos resultados não apresentaram associação significativa entre o perfil genotípico de DARC e a CCC, nem com os genótipos dos pacientes e os graus desta miocardite. Os graus de severidade moderado e grave apresentaram-se mais freqüentes em pacientes na faixa etária menor ou igual a 60 anos ($p=0,0098$). O sexo masculino foi fator preditor para a CCC (OR= 3,87; IC 95%: 1,30-11,56; $p=0,015$). **Conclusão:** Não houve associação entre as diferenças no perfil genotípico de DARC e a CCC, nem com os genótipos dos pacientes e os graus de severidade desta miocardite. Os pacientes na faixa etária menor ou igual a 60 anos apresentaram risco aumentado de desenvolver as formas mais graves da cardiopatia e o sexo masculino também foi associado com o risco aumentado para a CCC.

Palavras- chaves: Doença de Chagas, Cardiopatia Chagásica Crônica, DARC, Quimiocinas.

Abstract

Introduction: The Duffy histo-blood group antigens, with moderate immunogenic transmembrane glycoprotein, encoded by the alleles FYA and FYB, were identified as receptors for chemokines and, therefore, called DARC (Duffy Antigen / Receptor for Chemokine). The link of this receptor with 16 inflammatory chemokines has already been proved. The Duffy antigen may be involved when "sweeping" the excess of these inflammatory mediators from sites of inflammation and, possibly reducing the damage caused by this exacerbated production. The inflammatory chemokines play an important role in regulating the immune response, however, when produced in excess, they may contribute to tissue lesions observed in Chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), which is most prevalent form of Chagas disease. This pathology is the result of an inflammatory process, since one of the pathological characteristics is the presence of a large number of inflammatory cells in the myocardium, which are characterized by the presence of diffuse myocarditis with an intense myocardial remodeling, fibrosis, hypertrophy and lesion of the cardiac muscle fibers. Experiments conducted with some chemokines and CCC showed that elevated plasma levels of these inflammatory mediators were associated with the severity of disease in these patients. The local production of chemokines may also be extremely important in cardiac damage observed in CCC. **Objectives:** To determine if there are differences in the genotypic profile of DARC among T.cruzi-seropositive individuals, with and without CCC and, to verify if there is an association of these patients genotypes with the degrees of the disease severity, as well as to investigate the association between gender and age of individuals and CCC. **Methods:** The study included 95 individuals, among them 74 were patients, who presented the clinical form of Chronic chagasic cardiomyopathy, and 21

individuals without detectable cardiac manifestations. The molecular analysis was performed by Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Data were evaluated by multiple logistic regression and Chi-square or Fisher's exact test. **Results:** Our results did not show either any significant association between the genotypic profile of DARC and the CCC, or with the patients' genotypes and the degrees of myocarditis. The degrees of severe and moderate severity were more frequent in patients aged less than or equal to 60 years of age, $p = 0.0098$. . The male gender was a predictor factor for the CCC (OR = 3.87, 95% CI: 1.30-11.56; $p=0.015$). **Conclusion:** There was neither an association between the differences in the genotypic profile of DARC and the CCC, nor with the patients' genotypes and the degree of severity of myocarditis. Patients aged less than or equal to 60 years of age presented an increased risk of developing the most severe forms of the cardiopathy and, male gender was also associated with increased risk for CCC.

Keywords: Chagas disease, Chronic chagasic cardiomyopathy, DARC, Chemokines.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

O gene Duffy (*FY*), localizado no cromossomo humano número 1,⁽¹⁾ apresenta dois éxons.⁽²⁾ As formas alélicas deste gene, *FYA* e *FYB*, são codominantemente expressas e diferem entre si pela substituição de uma base G por outra A no nucleotídeo 125, que corresponde à substituição do aminoácido glicina por asparagina na posição 42 da glicoproteína Duffy (gp-Fy), resultando em um polimorfismo comum na população caucasiana.⁽³⁾ Na região promotora do gene *FY*, no nucleotídeo -33, pode ocorrer uma mutação pontual em que a T é substituída pela C (-33T>C), a qual resulta em uma variante do alelo *FYB* (*FYB-33*).^(2,4)

Os antígenos do sistema histo-sanguíneo Duffy são glicoproteínas transmembrânicas moderadamente imunogênicas, codificadas pelos alelos *FYA* e *FYB*.⁽⁵⁾ Com o uso dos anticorpos específicos para estes antígenos é possível determinar quatro fenótipos eritrocitários: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+) e Fy(a-b-), sendo este último, resultado da mutação descrita anteriormente na região promotora do gene *FY*.^(2,4,6,7) Os antígenos Fy^a e Fy^b são expressos nos eritrócitos, em células de Purkinje do cerebelo, nas células epiteliais dos rins e dos pulmões, e ainda, na superfície de células endoteliais de vênulas e microvasos.^(5,8,9-13) Os indivíduos com fenótipo Fy (a-b-) não apresentam o antígeno Duffy em suas hemáceas, as quais não possuem alterações estruturais e funcionais, sendo aparentemente normais.⁽¹⁴⁾ No entanto, a expressão antigênica é mantida nos endotélios determinando importante papel na fisiopatologia da inflamação.^(8,11)

Uma característica deste sistema histo-sanguíneo é a distribuição diferencial dos determinantes antigênicos entre grupos étnicos. *FYA* é prevalente em europeus, chineses, japoneses e malasianos, porém raro em africanos. Já o *FYB* é abundante nas

populações caucasianas do que em asiáticos e negros africanos.^(15,16) Indivíduos homocigotos para o alelo *FYB-33* são comuns em etnia negra.⁽¹⁷⁾ No Brasil, um estudo de genotipagem, realizado na cidade de Campinas, no Estado de São Paulo, com doadores de sangue verificou as seguintes frequências genotípicas: *FYA/FYA* (11,3%); *FYBFYB* (29,9%); *FYAFYB* (39,9%) e *FYB-33/FYB-33* (19,7%).⁽¹⁸⁾

Experimentos realizados com indivíduos Duffy positivos resultaram na internalização da Interleucina-8 (CXCL8/IL-8) na superfície dos eritrócitos, por isso, os antígenos do sistema histo-sanguíneo Duffy foram identificados como receptores para quimiocinas e denominados DARC (*Duffy Antigen/ Receptor for Chemokine*).^(5,19-22) O DARC foi caracterizado como um receptor multiespecífico para ambas as famílias de quimiocinas, CC (β -quimiocinas) e CXC (α -quimiocinas) com alta afinidade^(21,22) e se liga apenas às quimiocinas inflamatórias.^(23,24) A afinidade de DARC foi comprovada com 16 quimiocinas, representados por: CXCL1 (GRO α), CXCL2 (GRO β), CXCL3 (GRO γ), CXCL4 (PF4), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL7 (NAP-2), CXCL8 (IL-8) e CXCL11 (I-TAC), pertencentes à família CXC e CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL11 (Eotaxin), CCL13 (MCP-4), CCL14 (HCC-1) e CCL17 (TARC), membros da família CC.⁽²³⁻²⁵⁾

DARC pode estar envolvido no transporte de quimiocinas de tecidos inflamados para a superfície luminal do endotélio, o qual favorece a migração dos leucócitos envolvidos na inflamação.⁽²⁶⁻²⁸⁾ Além disso, o antígeno Duffy pode contribuir na “varredura” do excesso de quimiocinas dos locais de inflamação, desempenhando um importante papel na regulação dos níveis destes mediadores inflamatórios na circulação.^(19,24) As quimiocinas inflamatórias desempenham importante papel na

regulação da resposta imune, no entanto quando produzidas em excesso podem contribuir para lesões teciduais observadas em diversas doenças.^(29,30)

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas foi descoberta e descrita em 1909 pelo grande cientista Carlos Chagas, que descreveu detalhadamente tanto o ciclo de transmissão quanto as manifestações clínicas agudas da doença. Esta parasitose tem como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, o qual pertence ao filo Protozoa, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*.^(31,32) A doença de Chagas é endêmica nas Américas, principalmente na América Latina, no entanto, devido a imigrações, ocorreu aumento dos casos da doença em países como os Estados Unidos e Canadá, em algumas partes da Europa e no Oeste do Pacífico.⁽³³⁾ Há estimativa de que entre 15 e 17 milhões de pessoas na América Latina estejam infectadas pelo *T. cruzi*.^(33,34)

O *T. cruzi* pode ser transmitido ao homem e a outros vertebrados por diversos mecanismos, sendo o vetorial o meio de transmissão de maior importância epidemiológica. Os insetos vetores são os triatomíneos e o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as três espécies vetoras mais relevantes na transmissão de *T. cruzi* para o homem. Além desses, há outros mecanismos de transmissão como transfusões sanguíneas e transmissão congênita, os quais foram relatados principalmente em zonas urbanas e países não endêmicos. Ainda há meios de transmissão denominados secundários tais como acidentes de laboratório, transplantes de órgãos e ingestão de caldo de cana e açaí contaminados com *T. cruzi*.⁽³³⁾

O ciclo biológico do *T. cruzi* é complexo e do tipo heteroxênico, pois o parasito passa por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e extracelular no inseto vetor. Durante o hematofagismo, o hospedeiro invertebrado é infectado pela ingestão de formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e, posteriormente, no estômago do inseto, estas se transformam em formas epimastigotas. No intestino médio, os epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples, depois, na porção terminal do tubo digestivo, eles se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, sendo as formas infectantes para os vertebrados. Durante ou logo após o repasto sanguíneo, esta é eliminada junto com as fezes e urina do inseto vetor na pele do hospedeiro vertebrado, podendo penetrar pelo local da picada, mucosas ou superfície e, posteriormente, interagir e invadir células nucleadas do sistema fagocítico mononuclear. No interior das células, ocorre a diferenciação dos tripomastigotas metacíclicos em amastigotas por divisão binária simples. A seguir, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos, ocorre o rompimento das células e os parasitos são liberados para o meio extracelular, podendo invadir novas células para cumprirem novo ciclo celular ou permanecerem na corrente sanguínea, onde podem ser ingeridos pelo vetor caso o indivíduo seja picado novamente, continuando o ciclo do *T. cruzi*.⁽³⁵⁾ (Figura 1).

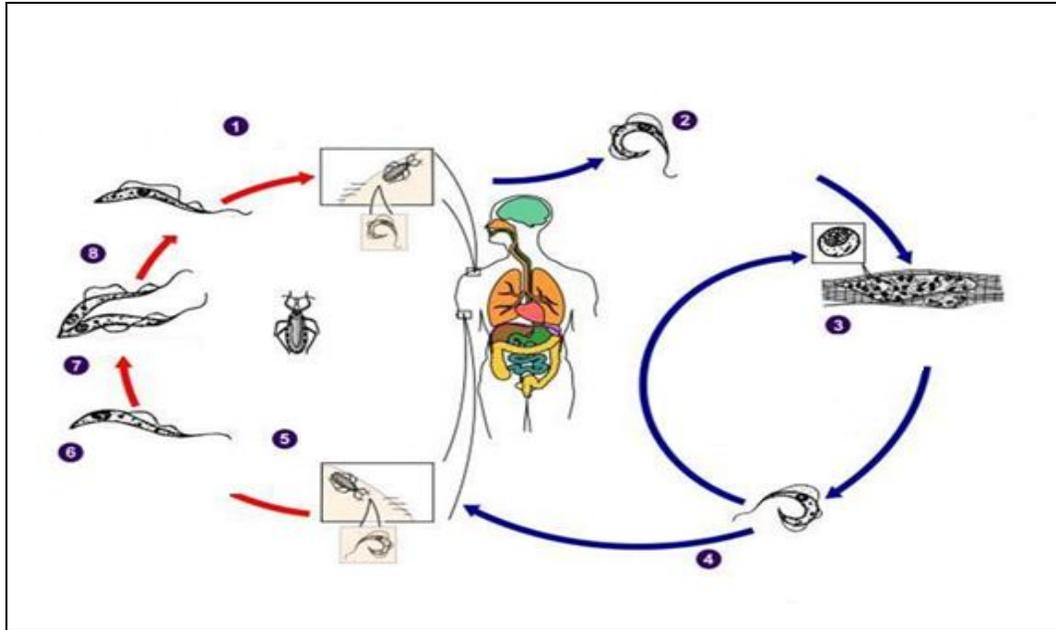


Figura 1. Ciclo de vida do protozoário *Trypanosoma cruzi* – (1) Durante o hematofagismo, o inseto infectado elimina os tripomastigotas metacíclicos nas fezes e urina. (2) Os tripomastigotas invadem células, como os macrófagos, onde se transformam em amastigotas. (3) Dentro das células os amastigotas multiplicam-se por divisão binária simples. (4) Os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos, ocorre lise celular e os parasitos são liberados na corrente sanguínea, podendo invadir novas células para cumprirem novo ciclo celular. (5) Os tripomastigotas sanguíneos podem ser ingeridos por novo inseto, continuando o ciclo do parasito. (6) No estômago do inseto os tripomastigotas sanguíneos se transformam em epimastigotas. (7) Os epimastigotas se multiplicam por divisão binária simples. (8) Os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos.⁽³⁶⁾

Há duas fases sucessivas na doença de Chagas: uma fase aguda e uma fase crônica. Os sintomas iniciais da fase aguda da doença são representados por manifestações locais, tais como o sinal de romaña, se o *T. cruzi* penetra na conjuntiva ou chagoma de inoculação, quando o *T. cruzi* penetra pela pele. As manifestações usuais desta fase incluem febre, edema localizado e generalizado, poliadenia, hepatomegalia, esplenomegalia, além de insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas (consequência da meningoencefalite que ocorre apenas em crianças e pacientes imunocomprometidos).⁽³⁵⁾ Após a fase aguda, a maioria dos indivíduos passa por um longo período assintomático, que é denominado de forma indeterminada da infecção e, entre 30 e 40% destes indivíduos, após permanecerem assintomáticos por vários anos, podem desenvolver uma das seguintes formas da doença: cardíaca, digestiva ou mista.⁽³³⁾ O comprometimento cardíaco é o mais importante aspecto clínico desta parasitose, pela frequência e gravidade, uma vez que a miocardiopatia inflamatória também conhecida como Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) é a forma mais prevalente, que acomete entre 25% e 30% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*.^(37,38)

A CCC é o resultado de um processo inflamatório, uma vez que uma das características patológicas é a presença de um grande número de células inflamatórias no miocárdio, que pode ser devido ao tropismo cardíaco do parasita. Ocorre o recrutamento de leucócitos e migração de células do sistema imune, que depende da produção local de citocinas e quimiocinas, bem como da expressão de seus receptores e moléculas de adesão.⁽³⁰⁾ Esta doença é caracterizada pela presença de miocardite difusa com um processo de intensa remodelação miocárdica, fibrose, hipertrofia e lesão das fibras musculares cardíacas.^(39,40) E ainda, ocorre um progressivo afinamento do

músculo cardíaco, o qual leva à dilatação das cavidades do coração, culminando com a incapacidade de bombeamento adequado do sangue para o organismo, sendo este quadro denominado insuficiência cardíaca congestiva (ICC). É importante ressaltar que a CCC é uma indicação comum para o implante de marca-passos cardíacos.^(37,41)

As manifestações clínicas variam de acordo com o grau de lesão do miocárdio e incluem insuficiência cardíaca, arritmias, bloqueios cardíacos, morte súbita, tromboembolismo e derrame.⁽³⁷⁾ Há três mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento desta miocardiopatia: comprometimento do sistema nervoso autônomo (regulador das contrações cardíacas), alterações da microcirculação e danos teciduais resultantes da resposta imune.⁽⁴²⁾ Além disso, dados clínicos sugerem que o infiltrado inflamatório desempenha papel relevante no desenvolvimento e progressão da doença de Chagas, pois o infiltrado mononuclear está associado à maior destruição de cardiomiócitos e fibrose local na CCC.^(40,43)

A patogênese da CCC ainda não está totalmente estabelecida, por isso diferentes mecanismos têm sido propostos para melhor compreendê-la, como a persistência do parasita e auto-imunidade. Durante a doença de Chagas, o parasito pode desempenhar um papel na patogênese cardíaca por induzir diretamente os danos no miocárdio e ainda, a variabilidade genética entre as populações do *T. cruzi* diferem no desenvolvimento da doença. Em fases avançadas, mesmo na ausência de parasitos, foi observada uma forte resposta inflamatória, o que explica a hipótese auto-imune da CCC.⁽³⁰⁾ Experimentos realizados com o objetivo de explicar a agressão ao tecido cardíaco na ausência do parasito indicaram que, o desencadeador do infiltrado inflamatório era o reconhecimento cruzado da miosina cardíaca, a proteína mais

abundante do coração, a qual apresenta semelhanças antigênicas com a proteína recombinante B 13 do *T. cruzi*.⁽³⁸⁾

A mobilização das células do sistema imunológico é crucial na redução da carga parasitária. As células *Natural Killer* (NK) podem ser consideradas importante fonte de IFN- γ e TNF- α , duas citocinas relevantes na ativação de outras células, como os macrófagos, capacitando-as a destruir microorganismos intra e extracelulares. A infecção dos macrófagos pelo *T. cruzi* pode induzir a secreção de Interleucina-12 (IL-12) por estas células, o que leva ao aumento da produção de IFN- γ e TNF- α , resultando no controle da parasitemia e mortalidade.⁽⁴⁴⁾ A produção destas citocinas ativa a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que catalisa a síntese de Óxido Nítrico (NO) pelos macrófagos, o qual inibe a replicação do parasita. Na resposta imune do tipo TH1, os linfócitos T CD4+ e T CD8+ também produzem IFN- γ , TNF- α e IL-12, sendo que esta resposta apresenta um papel protetor, pois também há síntese de Óxido Nítrico (NO), a qual exerce uma potente ação tripanocida.^(30,33)

As citocinas desempenham papéis fundamentais no controle da replicação do parasita e na regulação da resposta imune.⁽³⁰⁾ Durante a fase aguda da doença de Chagas, ocorre produção elevada de citocinas inflamatórias tais como IL-12, TNF- α e IFN- γ , e das seguintes quimiocinas, CCL2, CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 e CXCL10 (IP-10).^(42,45) Na fase crônica da doença, ocorre aumento na produção de mediadores inflamatórios, provavelmente em resposta a persistência do parasita, resultando em níveis plasmáticos elevados de TNF- α e IFN- γ , o que também foi verificado em pacientes com a forma indeterminada da infecção. E ainda, foram observados níveis elevados na circulação de TNF- α e CCL2 de pacientes com CCC, quando comparados com os indivíduos da forma indeterminada.⁽⁴²⁾ Neste contexto é

importante destacar as quimiocinas CCL2 e CCL5, as quais possuem como receptor o DARC.⁽²³⁻²⁵⁾

Experimentos recentes com quimiocinas apontaram a expressão elevada de CCL5 em cães com a forma cardíaca da doença de Chagas, quando comparados com aqueles que apresentam a forma indeterminada, um modelo bem semelhante ao estudo da doença de Chagas humana.⁽⁴⁶⁾ Também foi verificada expressão elevada de genes que codificam as quimiocinas CCL2, CCL8 (MCP-2) e CCL7 no coração de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*.⁽⁴⁷⁾ A concentração da quimiocina CCL2 no coração foi diretamente associada com a intensidade da miocardite aguda e crônica em camundongos C3H/He infectados com a cepa colombiana do *T. cruzi*.⁽⁴⁸⁾

Níveis plasmáticos elevados de quimiocinas como CCL2 e TNF- α foram associados com a gravidade da doença em pacientes com CCC, e esta última, foi diretamente correlacionada com o grau de disfunção cardíaca.⁽⁴⁹⁾ De acordo com experimentos realizados por Cunha-Neto et al.,⁽⁵⁰⁾ IFN-gama e CCL2 podem estar relacionadas com a expressão de genes dos cardiomiócitos envolvidos no processo de hipertrofia patológica. Níveis elevados de quimiocinas no tecido cardíaco foram verificados em pacientes que apresentam a CCC. Além disso, outros dados sugerem que a produção local destes mediadores inflamatórios pode desempenhar uma função de grande importância nos danos cardíacos observados na CCC.⁽³⁸⁾

A associação entre o sistema histo-sanguíneo Duffy e algumas doenças foram relatadas. O *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium knowlesi* interagem com o antígeno Duffy e os indivíduos que não expressam esta glicoproteína nos eritrócitos são resistentes à malária por estas espécies,^(51,52). Porém já foram relatados casos de

indivíduos Duffy negativos com malária vivax no Brasil e na África.^(53,54) A expressão de DARC pode atenuar o potencial de crescimento e metástase do carcinoma espinocelular de laringe⁽⁵⁵⁾ e a ausência deste receptor no eritrócito pode contribuir para o aumento da incidência do câncer de próstata e mortalidade.^(56,57) Experimentos realizados verificaram que indivíduos com a ausência de DARC nas células vermelhas apresentaram aumento de 40% no risco da aquisição do HIV, embora estes indivíduos apresentassem uma progressão mais lenta da doença.^(58,59) Assim, DARC está envolvido em diversas doenças e diferenças na expressão deste receptor podem resultar na diversidade do curso de algumas moléstias, além de susceptibilidade diferencial às mesmas.

1.2 Objetivos

Diante dos dados apresentados, o presente estudo teve como objetivo geral verificar a hipótese de variações no genótipo de *FY* estarem envolvidas na Doença de Chagas. Os objetivos específicos compreendem:

1. Determinar se há diferenças no perfil genotípico de DARC entre indivíduos sororreagentes para *T. cruzi*, com e sem CCC.

2. Verificar se há associação entre o polimorfismo G125A no éxon 2 e a mutação T-33C na região promotora do gene com o grau de severidade da Cardiopatia Chagásica Crônica.

3. Investigar se existe associação entre o gênero e idade dos indivíduos e a Cardiopatia Chagásica Crônica.

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

2. Artigos Científicos

Os resultados deste trabalho estão apresentados em forma de artigo, um já aceito para publicação e o outro a ser submetido.

Artigo 1

Título: Chagas disease and Duffy antigen/receptor for chemokine (DARC): a mini-review

Autores: Amanda Priscila de Oliveira, Luiz Carlos de Mattos, Carlos Eugênio Cavasini

Periódico: The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, aceito para publicação.

Artigo 2

Título: DARC na Doença de Chagas: avaliação na presença e ausência de Cardiopatia Chagásica Crônica

Autores: Amanda Priscila de Oliveira, Rudiane Daniela Vicentine, Ana Carolina Joazeiro, Reinaldo Bulgarelli Bestetti, Luiz Carlos de Mattos, Carlos Eugênio Cavasini

Periódico: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, a ser submetido para publicação.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo 1

Título: Chagas disease and Duffy antigen/receptor for chemokine (DARC): a mini-review

Autores: Amanda Priscila de Oliveira, Luiz Carlos de Mattos, Carlos Eugênio Cavasini

Periódico: The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, aceito para publicação.



J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis
 has an Impact Factor of 0.479
 (© 2009 Journal Citation Reports,
 published by Thomson Reuters)

ISSN 1678-9199

Hello, Carlos Eugenio Cavasini. Welcome!

[Logout!](#)

[Home](#) | [About Us](#) | [Contact](#)

Painel de Controle

The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases
Carlos Eugenio Cavasini

Principal


Dados Pessoais


Painel do Autor


Painel do Administrador


Painel do Co-Autor


Painel do Parecerista


Painel do Bibliotecário

Painel do Autor


Adicionar Artigo


Alterar Status Artigo

Alterar Artigo

ID	Título do Artigo	Nome Completo	E-mail	Status	Data	Delete
1520	Contribution of DARC in Chagas Disease	Carlos Eugenio Cavasini	oecavasini@yahoo.com.br	Pareceristas (Peer Review)	07/04/2011	




Chagas disease and Duffy antigen/receptor for chemokine (DARC): a mini-review

Amanda Priscila de Oliveira¹, Luiz Carlos de Mattos², Carlos Eugênio Cavasini³

1. Mestranda em Ciências da Saúde. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

2. Professor Adjunto, Livre Docente. Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

3. Professor Adjunto Doutor, Centro de Investigação de Microrganismos do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

ABSTRACT: Duffy gene (*FY*) codifies the transmembrane glycoprotein Duffy (gp-Fy) from 35 to 43 KDa moderately immunogenic. This glycoprotein is polymorphic, and it constitutes the antigens of the Duffy histo-blood system, that were designated as receptors for chemokines and denominated DARC (Duffy Antigen / Receptor for Chemokine). This receptor has an important role in the regulation of the chemokines levels of the circulation, since it binds and adsorbs them on the surface of the red cells, as a reservoir. It plays a "sink" role, which can contribute to homeostasis removing the inflammatory chemokines of the circulation as well as their maintenance in the plasmatic levels. Chronic **Chagas Cardiopathy** (CCC) is the most frequent form of Chagas disease. It is an inflammatory disease, in which the infiltrated inflammatory plays an important role in the development and progression of the disease. High levels of chemokines in the plasma were associated with the disease severity in patients with heart failure. In this context, the profile of DARC expression could carry out an important function as receptor for chemokines in Chagas Disease, in patients with CCC, being able to modulate the damages of this inflammatory disease.

KEY WORDS: DARC antigen, Duffy Blood-Group System, Chagas disease, Chagas Cardiomyopathy

CONFLICTS OF INTEREST: There is no conflict.

CORRESPONDENCE TO:

CARLOS EUGENIO CAVASINI, Centro de Investigação de Microorganismos, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, CEP:15090-000, Vila São Pedro. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Telefone: (17) 3201-5736. Email: cecavasini@yahoo.com.br

INTRODUCTION

Duffy gene (*FY*) codifies the transmembrane glycoprotein Duffy (gp-Fy) from 35 to 43 KDa moderately immunogenic (1). This glycoprotein is polymorphic, and it constitutes the antigens of the Duffy histo-blood system, which are codified by *FYA* e *FYB* alleles of the gene *FY* playing such co-dominant role. *FYA* e *FYB* alleles differ between them due to the substitution of base G by other A in the nucleotide 125, which develops a common polymorphism in the Caucasian population. This single nucleotide polymorphism (SNP) results in the substitution of amino acid glycine by asparagine in position 42 (2).

Although this polymorphism originates distinctive glycoproteins called Fya and Fyb antigens, both have moderate immunogenicity. They can be identified with the use of anti-Fya and anti-Fyb anti-sera, allowing the characterization of four erythrocyte phenotypes: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+) and Fy(a-b-) (3,4). Negative phenotype Duffy [Fy(a-b-)] is the result of a variant allele *FYB* (*FYB*-33), which presents a single point mutation in which occurs the substitution of T

by C in the nucleotide -33 (-33T>C), also known as GATA-BOX, located in the promoter region of the *FY* gene (5,6).

The differential distribution of DARC antigenic determinant among ethnic groups is a characteristic of this histo-blood system. As an example, *FYA* is prevalent in European, Chinese, Japanese and Malaysian populations, but rarely in African population. By the other hand, in Caucasian population *FYB* is widely found when comparing to Asian and African populations (7,8). Homozygote individuals for allele *FYB-33* (DARC negative) are common among African population, but mostly rare in other ethnic group (9). While in Brazil, some studies on intra-ethnic genetic diversity in five geographic regions showed some variations in the origin and ethnic composition of three subgroups (European, African and mixed descendants) (10). Therefore, the allele frequencies of *FY* from the distinctive ethnic groups were greatly important for the distribution of phenotype and genetic composition (11-15).

Duffy antigen is expressed in the erythrocytes, Purkinje cells of the cerebellum and epithelial cells of the kidneys and lungs (16,17,18-20). Erythrocytes with gp-Fy absence do not manifest alterations, therefore individuals with phenotype Fy (a-b-), who do not present antigen Duffy in their erythrocytes, are seemingly normal (21). The antigen Duffy was identified as receptor for malaria parasite, since individuals that do not express that protein in the erythrocytes cannot be invaded by *Plasmodium knowlesi* (22) and *Plasmodium vivax* (23). In Brazil, several studies demonstrated the association between the Duffy antigen and malaria by *P. vivax*, the first being held by Colauto et al, 1981 (24). However, current studies demonstrated the infection by *P. vivax* in individuals Fy (a-b-) from Brazil and Eastern Africa (25-28). Genetic mechanisms for Duffy-negative phenotype in the erythrocyte have preserved the expression of this receptor in the endothelium determining an important role in the inflammation physiopathology (16,19).

The antigens of the Blood Duffy System were designated receptors for chemokine and denominated DARC (Duffy Antigen/Receptor for Chemokine) (1), as a result of experiments performed in Duffy positive individuals, who absorbed Interleukin-8 (CXCL8/IL-8) on the erythrocyte surface (29-32).

The chemokines are small cytokines of 8 to 10 KDa molecular weight that induce directly the cell movement through the organism or induce some specific functions in the activated cells (33,34). The chemokines are classified in subfamilies according to the number and the location of the amino-terminal cysteine residues. Among them two main subfamilies are pointed out; CC, in which the cysteine residues are adjacent, and CXC, in which these residues are separated by an amino acid (35,36).

These proteins, the chemokines, can still be divided into inflammatory and homeostatic, based on the conditions and place of production (35-38). The inflammatory chemokines (or induced), such as: CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CCL11/eotaxin, CCL4/MIP-1 CCL2/MCP-1 and CXCL10/IP-10 are produced by several cells in response to inflammatory stimulus. They work in the cell recruitment such as the monocytes, granulocyte and T cells (effector) to the inflammation sites. While the homeostatic chemokines (or constitutive) are expressed constitutively, and they can be involved in both the organization of the lymphoid cell and the basal leucocyte traffic (36,40).

The IL-8 is involved in the recruitment process of the monocytes and neutrophils for sites of acute inflammatory response, besides promoting the activation of these cell types. It presents certain longevity in the sites of acute inflammation, being produced in the beginning of the inflammatory response, actively for a long period of time; that is, days and weeks. Several studies were performed on IL-8 and cardiovascular diseases, and some of them identified this chemokine in sites of vascular injury, while others demonstrated that it plays a role in several phases of the atherosclerosis, as a marker or as a potential therapeutic target (41). Experiments carried out by Kim et al. (42)

have pointed out IL-8 function of having considered relevance in the pathogenesis of the hypertension. Simonini et al. (43) evaluated its participation in the angiogenic activity of the atherosclerosis. They have concluded that IL-8 is an important angiogenesis mediator. Moreover, other authors demonstrated that the neutralization of this chemokine reduced the degree of necrosis significantly in an animal model of myocardial ischaemia-reperfusion injury (44,41).

Unlike other receptors for chemokines, DARC is a promiscuous receptor (45,46), because it interacts with both classes CC and CXC with high affinity, while most of the chemokine receptors link themselves just into one of the classes (31,45,47,48). The antigen Duffy is a receptor for the inflammatory chemokines. Experiments proved DARC affinity with 16 chemokines, such as CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL11, CCL2, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL14 and CCL17 (49,50). Immunohistochemical studies demonstrated the DARC expression on the surface of endothelial cells of venules and small veins (16,51), considered an important site of leukocytes recruitment to the inflammation sites, induced by the chemokines, facilitating their movement through the endothelium of different tissues (52). Studies suggest DARC contribution in the chemokine transcytosis from the intravascular to the extra vascular space, favoring the migration of the leukocytes involved in inflammation (50,53). DARC plays an important role in the regulation of the chemokine levels of the circulation, since it binds itself and adsorbs these on the surface of the red cells, as a chemokine reservoir, performing of "sink" role (29,50). Therefore, DARC can collaborate with the homeostasis in the removal of the inflammatory chemokines of the circulation, which avoids the loss of these inflammatory mediators for the organs and distant tissues, as well as in its maintenance in the plasmatic levels, due to subsequent liberation of the erythrocyte surface (50,54). However, the theory that DARC plays "sink" function has been questioned. Some authors demonstrated that there is no chemokine intracellular variation associated to

DARC (55). Thus, further investigations for better understanding of this role of DARC are necessary.

DARC is involved in several diseases of “classical” chemokine receptors such as the giant cell arteritis (56), diseases and renal transplantations, as well as, during acute rejection of transplantation (57-60). The susceptibility for asthma was correlated with the absence of DARC expression in the red cells in certain Afro-descendant populations (61). A recent study showed that the absence of DARC in the erythrocyte resulted in an increase of 40% in the risk of acquiring HIV, however, these individuals presented a short-term progression of the disease (55,62). Epidemiological data suggest that DARC absence in the erythrocyte has contributed to the increase of incidence and mortality of prostate cancer (46,63). DARC expression in the cancerous cells of the lung can be associated with the decrease of tumor vascularization and reduction of the metastatic potential (64), as well as decrease breast cancer cell growth, due to the kidnapping of angiogenic chemokines and inhibition of the tumor vascularization (65).

DARC AND CHAGAS DISEASE

Chagas disease was described by the great scientist Carlos Chagas in 1909. It is a parasitic disease that occurs particularly in America. Its etiological agent is the protozoan flagellated *Trypanosoma cruzi* belonging to the phylum Protozoa, order Kinetoplastida, family Trypanosomatidae and the gender *Trypanosoma* (66,67). The main transmission form to the human host is by the insects of the order hemiptera, Reduviidae family and *Triatoma*, *Panstrongylus* and *Rhodnius* genders (68,69). Other transmission mechanisms such as blood transfusions and congenital transmission were also reported mainly in urban areas and non-endemic countries (70). Nearly 15 to 16 million people are infected by *T. cruzi* in Latin America (71).

The inflammatory cytokines play a central role in the infection by *T. cruzi*. The acute phase of Chagas Disease is characterized by the exacerbated production

of inflammatory cytokines, among them, IL-12, TNF- α and IFN- γ , and chemokines, such as CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL10 (72,73). CCL5 and CCL2, which bind to the antigen Duffy, have been pointed out among these inflammatory mediators.

After the acute phase, most of the individuals is asymptomatic since they present the indeterminate form of Chagas Disease, while between 30 to 40% of parasite individuals can develop one kind of the following diseases: heart, digestive or mixed. The most frequent form, the inflammatory miocardiopathy also known as Chronic Chagasic Cardiopathy (CCC) accounts for 20% to 30% of the individuals (74).

CCC is an inflammatory disease, characterized by the presence of diffuse myocarditis with a remodeling process of intense myocardial, fibrosis, hypertrophy and lesion of the cardiac muscular fibers (75,76). Clinical data suggest that the infiltrated inflammatory plays an important role in the development and progression of Chagas disease, since the infiltrated mononuclear is associated with greater destruction of cardiomyocytes and local fibrosis in CCC (76,77). The development of this miocardiopathy involves three possible pathogenic mechanisms: cardiac dysautonomia, microcirculation changes and tissue damages resulting from the inflammatory and immune responses (73).

The chronic phase of the disease also presents high production of inflammatory cytokines, possibly due to longer exhibition to the parasite. An increase in the plasmatic levels of TNF- α and IFN- γ occurs; this is also observed in patients with the indeterminate form of the disease. Individuals with CCC present high levels of the TNF- α and CCL2 in the circulation, in relation to the patients with the indeterminate form (73). Among the inflammatory chemokines, it is important to point out those whose receptor is DARC, such as, CXCL8 / IL-8, CCL5/RANTES, CCL11/eotaxin and CCL2/MCP-1.

High chemokine concentrations in the plasma were associated with the severity of the disease in patients with CCC, as for example, high levels of CCL2 and

TNF- α , being the latter directly correlated with the degree of heart failure in these patients (78). Experiments carried out by Cunha-Neto et al. (79) suggest that IFN- γ and CCL2 are related with the gene expression of the cardiomyocytes involved in the pathological hypertrophy process. Moreover, the intensity of the acute and chronic myocarditis in mice (C3H/He) infected with the Colombian strain was directly associated with the chemokine concentration CCL2 in the heart (80).

The high expression of *CCR5* (receptor of CCL3, CCL4 and CCL5) was detected in leukocyte patients with Chagasic Cardiomyopathy. The polymorphism in the promoter region of the gene *CCR5* (*CCR5* 59029 A→G), associated with smaller expression of *CCR5* in the leukocytes, was more frequent in asymptomatic patients, when compared with ones with Chagasic Cardiomyopathy (78,81). Others studies showed that mice lacking the receptor *CCR5* presented a significant reduction of the infiltrated cardiac inflammatory, suggesting the importance of this receptor in the migration of lymphocytes and control of the local replication of parasite (82). Is important to emphasize that DARC presents a significant homology with the receptor *CCR5*, and it is also receptor for chemokine CCL5 (55).

Studies carried out by Damas et al. (83) demonstrated the presence of CCL2 and CXCL8 in the cardiomyocytes. This suggests important role of these cells in the inflammatory process, either by the chemokines production, or the expression of their receptor. The high expression of chemokines and their corresponding receptor in the myocardium and in the circulating leukocytes suggests a relevant function of these mediators in various forms of myocardial failure (84). Experiments carried out with patients that presented CCC resulted in high expression of chemokines in the heart tissue. Other data suggest that local production of these inflammatory mediators can carry out a function of great importance in the heart damages observed in CCC (85).

CONCLUDING REMARKS

Even though some studies have been investigating, the actual role of the chemokines in the myocardium disease is not completely explained. In this context, the profile of DARC expression plays an important role as receptor for chemokines in Chagas Disease, in patients with CCC. It could modulate the damages of this inflammatory disease. However, many aspects of the biology of Duffy antigens should be considered to determine their effective functions, because in spite of all knowledge on the relationship between structure/function and tissue location of DARC, the effective role of this receptor still remains uncertain in normal and damaged physiology.

ACKNOWLEDGEMENTS. Work carried out in the Micro-organism Investigation Centre of FAMERP. Financial support: CNPq # 135436/2009-5.

APO is a Master's student of the Postgraduate Course in Health Sciences of the Faculty of Medicine of Sao José do Rio Preto - FAMERP and received a grant from the Ministry of Science and Technology – CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), Brazil.

REFERENCES:

1. Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood* 1997;89:3077-91.
2. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10793-7.
3. Race RR, Sanger R. *Blood Groups in Man*. 6rd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1975.
4. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 10rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1997.
5. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 1995;10:224-8.
6. Iwamoto S, Li J, Omi T, Ikemoto S, Kajii E. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. *Blood* 1996;87:378-85.
7. Lewis Jr GE, Miller LH, Ibrahim L, Wong PW, McGinniss M, Ooi WL. Duffy phenotypes in Malaysian populations: correction of previous unusual findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 509-10.
8. Pogo AO, Chaudhuri A. The Duffy protein: A malarial and chemokine receptor. *Semin Hemat* 2000; 37:122-9.

9. Mourant A, Kopec A, Domaniewska-Sobczak K. The Distribution of the Human Blood Groups and Other Polymorphisms. 2nd ed. London: Oxford University Press; 1976.
10. Salzano FM, Bortolini MC. Normal genetic variation at the protein, glycoconjugate and DNA levels. *In*: Mascie-Taylor NCG, editor. The Evolution and Genetics of Latin American Population. 1th ed. Cambridge: University Press; 2002. p. 255.
11. Bortolini C, Weimer TA, Franco MH, Salzano FM, Layrisse Z, Schneider H et al. Genetic studies in three South American black populations. *Gene Geogr* 1992; 6:1-16.
12. Castilho L, Rios M, Pellegrino Jr J, Saad STO, Costa FF, Reid MR. A novel Fy allele in Brazilians. *Vox Sang* 2004; 87:190-5.
13. Dornelles CL, Callegari-Jacques SM, Robinson WM, Weimer TA, Franco MHLP, Hickmann AC et al. Genetics, Surnames, Grandparents' Nationalities, and Ethnic Admixture in Southern Brazil – Do the Patterns of Variation Coincide? *Gen Mol Biol* 1999; 22:151-61.
14. Parasol N, Cohen N, Zemishlany Z, Lerer B, Kosower NS. Duffy Antigen/Receptor for Chemokines (DARC): Genotypes in Ashkenazi and Non-Ashkenazi Jews in Israel. *Hum Biol* 2001; 73: 307-313.
15. Stalote AC, Proto-Siqueira R, Da Silva Jr WA, Zago MA, Palatnik M. The mutation G298A→Ala100Thr on the coding sequence of the Duffy antigen/chemokine receptor gene in non-caucasian Brazilians. *Gen Mol Res* 2005; 4:166-73.
16. Hadley TJ, Lu ZH, Wasniowska K, Martin AW, Peiper SC, Hesselgesser J et al. Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific

chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. *J Clin Invest* 1994;94:985-91.

17. Girard JP, Baekkevold ES, Yamanaka T, Haraldsen G, Brandtzaeg P, Amalric F. Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am J Pathol* 1999;155:2043-55.

18. Horuk R, Martin AW, Wang Z, Schweitzer L, Gerassimides A, Guo H et. al. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol* 1997;158:2882-90.

19. Peiper SC, Wang ZX, Neote K, Martin AW, Showell HJ, Conklyn MJ et. al. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J Exp Med* 1995;181:1311-7.

20. Chaudhuri A, Nielsen S, Elkjaer ML, Zbrzezna V, Fang F, Pogo AO. Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs. *Blood* 1997;89:701-12.

21. Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Br J Haematol* 1995;90:823-9.

22. Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 1975;189:561-3.

23. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976;295:302-4.
24. Colauto EMR, Barraviera B, Meira da, Matsubara IS, Pellegrino-Junior J, Machado Pea et al. Malária no município de Humaitá, Estado do Amazonas. XII - Frequencia de fatores de resistência eritrocitária na população geral e em doentes: Hemoglobina S e sistem Sanguineo Duffy. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1981;23(supl.5):72-8.
25. Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Dunton RF, Mtalib R, Koros J et. al. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:575-81.
26. Rosenberg R. *Plasmodium vivax* in Africa: hidden in plain sight? *Trends Parasitol* 2007;23:193-6.
27. Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, Moretti LJ et. al. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 2007;6:167.
28. Culleton RL, Mita T, Ndounga M, Unger H, Cravo PV, Paganotti GM et. al. Failure to detect *Plasmodium vivax* in West and Central Africa by PCR species typing. *Malar J* 2008;7:174.
29. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hébert CA, Valente AJ et. al. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest* 1991;88:1362-9.
30. Neote K, Darbonne W, Ogez J, Horuk R, Schall TJ. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *J Biol Chem* 1993;268:12247-9.

31. Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ et. al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993;261:1182-4.
32. Horuk R, Wang ZX, Peiper SC, Hesselgesser J. Identification and characterization of a promiscuous chemokine-binding protein in a human erythroleukemic cell line. *J Biol Chem* 1994;269:17730-3.
33. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-45.
34. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999;20:254-7.
35. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286:2098-102.
36. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000;18:593-620.
37. Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol* 2000;74:127-80.
38. von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000;343:1020-34.
39. Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 2000;12:336-41.

40. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2001;2:123-8.
41. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2009;84:353-60.
42. Kim HY, Kang YJ, Song IH, Choi HC, Kim HS. Upregulation of interleukin-8/CXCL8 in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2008;31:515-23.
43. Simonini A, Moscucci M, Muller DW, Bates ER, Pagani FD, Burdick MD et. al. IL-8 is an angiogenic factor in human coronary atherectomy tissue. *Circulation* 2000;101:1519-26.
44. Boyle EM Jr, Kovacich JC, Hèbert CA, Canty TG Jr, Chi E, Morgan EN et. al. Inhibition of interleukin-8 blocks myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:114-21.
45. Szabo MC, Soo KS, Zlotnik A, Schall TJ. Chemokine class differences in binding to the Duffy antigen-erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* 1995;270:25348-51.
46. Lentsch AB. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) and prostate cancer. A role as clear as black and white? *FASEB J* 2002;16:1093-5.
47. Chaudhuri A, Zbrzezna V, Polyakova J, Pogo AO, Hesselgesser J, Horuk R. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994;269:7835-8.
48. Lu ZH, Wang ZX, Horuk R, Hesselgesser J, Lou YC, Hadley TJ et. al. The promiscuous chemokine binding profile of the Duffy antigen/receptor for

chemokines is primarily localized to sequences in the amino-terminal domain. *J Biol Chem* 1995;270:26239-45.

49. Gardner L, Patterson AM, Ashton BA, Stone MA, Middleton J. The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:306-12.

50. de Brevern AG, Autin L, Colin Y, Bertrand O, Etchebest C. In silico studies on DARC. *Infect Disord Drug Targets* 2009; 9:289-303.

51. Rot A. Contribution of Duffy antigen to chemokine function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:687-94.

52. Lee JS, Frevert CW, Thorning DR, Segerer S, Alpers CE, Cartron JP et. al. Enhanced expression of Duffy antigen in the lungs during suppurative pneumonia. *J Histochem Cytochem* 2003;51:159-66.

53. Pruenster M, Mudde L, Bombosi P, Dimitrova S, Zsak M, Middleton J et. al. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol* 2009;10:101-8.

54. Pruenster M, Rot A. Throwing light on DARC. *Biochem Soc Trans* 2006;34:1005-8.

55. Horne K, Woolley IJ. Shedding light on DARC: the role of the Duffy antigen/receptor for chemokines in inflammation, infection and malignancy. *Inflamm Res* 2009;58:431-5.

56. Brühl H, Vielhauer V, Weiss M, Mack M, Schlöndorff D, Segerer S. Expression of DARC, CXCR3 and CCR5 in giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:309-13.

57. Liu XH, Hadley TJ, Xu L, Peiper SC, Ray PE. Up-regulation of Duffy antigen receptor expression in children with renal disease. *Kidney Int* 1999;55:1491-500.
58. Segerer S, Regele H, Mack M, Kain R, Cartron JP, Colin Y et. al. The Duffy antigen receptor for chemokines is up-regulated during acute renal transplant rejection and crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 2000;58:1546-56.
59. Segerer S, Cui Y, Eitner F, Goodpaster T, Hudkins KL, Mack M et. al. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *Am J Kidney Dis* 2001;37:518-31.
60. Segerer S, Böhmig GA, Exner M, Colin Y, Cartron JP, Kerjaschki D et. al. When renal allografts turn DARC. *Transplantation* 2003;75:1030-4.
61. Vergara C, Tsai YJ, Grant AV, Rafaels N, Gao L, Hand T et. al. Gene encoding Duffy antigen/receptor for chemokines is associated with asthma and IgE in three populations. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1017-22.
62. He W, Neil S, Kulkarni H, Wright E, Agan BK, Marconi VC et. al. Duffy antigen receptor for chemokines mediates trans-infection of HIV-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS susceptibility. *Cell Host Microbe* 2008;4:52-62.
63. Shen H, Schuster R, Stringer KF, Waltz SE, Lentsch AB. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth. *FASEB J* 2006;20:59-64.
64. Addison CL, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM. Overexpression of the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) by NSCLC tumor cells results in increased tumor necrosis. *BMC Cancer* 2004;4:14-28.

65. Wang J, Ou ZL, Hou YF, Luo JM, Shen ZZ, Ding J et. al. Enhanced expression of Duffy antigen receptor for chemokines by breast cancer cells attenuates growth and metastasis potential. *Oncogene* 2006;25:7201-11.
66. Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala F. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:115–9.
67. Ramirez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Lages-Silva E. First evidence of *Trypanosoma rangeli* in the southeast of Brasil, an endemic region to Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31:99-102.
68. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 1979; 163: 125-520.
69. Carvalho RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Vol. II. 1ª ed. Editora Fiocruz; 1998.
70. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375:1388-402.
71. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed- a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:113-22.
72. Bilate AM; Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50:67-74.
73. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC et. al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:252-8.

74. Rassi A Jr, Rassi A, Little WC. Chagas heart disease. *Clin Cardiol* 2000; 23:883–9.
75. Pereira Barretto AC, Mady C, Arteaga-Fernandez E, Stolf N, Lopes EA, Higuchi ML et. al. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am Heart J* 1986;111:307-12.
76. Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G 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* 1987;10:665-70.
77. Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J et. al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:157-60.
78. Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, Correa-Oliveira R, Teixeira MM. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. *J Infect Dis* 2004;189:214-20.
79. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatou D, Benvenuto L, Higuchi ML et. al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* 2005;167:305-13.
80. Lannes-Vieira J, Silverio JC, Pereira IR, Vinagre NF, Carvalho CM, Paiva CN et. al. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors--how to make a dream come true. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:226-35.

81. Calzada JE, Nieto A, Beraún Y, Martín J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 2001;58:154-8.
82. Machado FS, Koyama NS, Carregaro V, Ferreira BR, Milanezi CM, Teixeira MM et. al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 2005;191:627-36.
83. Damås JK, Eiken HG, Oie E, Bjerkeli V, Yndestad A, Ueland T et. al. Myocardial expression of CC- and CXC-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 2000;47:778-87.
84. Aukrust P, Damås JK, Gullestad L, Frøland SS. Chemokines in myocardial failure -- pathogenic importance and potential therapeutic targets. *Clin Exp Immunol* 2001;124:343-5.
85. Cunha-Neto E, Teixeira PC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmun Rev* 2011; 10:163-5.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Artigo 2

Título: DARC na Doença de Chagas: avaliação na presença e ausência de Cardiopatia Chagásica Crônica

Autores: Amanda Priscila de Oliveira, Rudiane Daniela Vicentine, Ana Carolina Joazeiro, Reinaldo Bulgarelli Bestetti, Luiz Carlos de Mattos, Carlos Eugênio Cavasini

Periódico: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, a ser submetido para publicação.

DARC na Doença de Chagas: avaliação na presença e ausência de Cardiopatia Chagásica Crônica

Amanda Priscila de Oliveira¹, Rudiane Daniela Vicentine², Ana Carolina Perpétua Joazeiro³, Reinaldo Bulgarelli Bestetti⁴, Luiz Carlos de Mattos⁵, Carlos Eugênio Cavasini⁶

1. Mestranda em Ciências da Saúde. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

2. Médica residente do Hospital de Base – FUNFARME, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

3. Mestranda da Faculdade de Ciências Veterinárias do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

4. Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital de Base – FUNFARME, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

5. Professor Livre Docente do Laboratório de Imunogenética do departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

6. Professor Adjunto do Centro de Investigação de Microrganismos do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Carlos Eugênio Cavasini

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, CEP:15090-000, Vila São Pedro. São José do
Rio Preto, SP, Brasil.

Telefone: 3201-5736

E-mail: cecavasini@famerp.br

Apoio: Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq).

Resumo

Introdução: A Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC), a forma mais frequente da doença de Chagas, acomete cerca de 30% dos indivíduos parasitados pelo *Trypanosoma cruzi*. As quimiocinas podem desempenhar um papel importante nos danos cardíacos observados nesta doença. O DARC (*Duffy Antigen/ Receptor for Chemokine*) pode remover o excesso de quimiocinas dos locais de inflamação e, possivelmente, atenuar os danos causados pela produção exacerbada destes mediadores.

Objetivos: Determinar diferenças genótípicas de DARC entre indivíduos sororreagentes para *T. cruzi*, com e sem CCC e, nestes, verificar se há associação dos genótipos com a severidade da doença; investigar se existe associação entre o sexo e idade dos indivíduos e a CCC. **Métodos:** Foram incluídos 74 pacientes com CCC e 21 indivíduos sem cardiopatia. A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP. Na análise estatística foi utilizada a Regressão Logística Múltipla e os testes Qui-quadrado ou exato de Fisher. **Resultados:** Os graus de severidade moderado e grave apresentaram-se mais frequentes em pacientes na faixa etária ≤ 60 anos ($p= 0,0098$). O sexo masculino foi fator preditor para a CCC (OR= 3,87; IC 95%: 1,30-11,56; $p=0,015$). As diferenças genótípicas entre os pacientes com CCC não foram estatisticamente significante.

Conclusão: Não houve associação entre os genótipos avaliados e a CCC, nem com o seu grau de severidade. Os pacientes na faixa etária menor ou igual a 60 anos apresentaram risco aumentado de desenvolver as formas mais graves da cardiopatia e o sexo masculino foi associado com o risco aumentado para a CCC.

Palavras-chaves: Doença de Chagas, Cardiopatia Chagásica Crônica, DARC, Quimiocinas.

Abstract

Introduction: Chronic chagasic cardiomyopathy (CCC), the most common form of Chagas disease, affects approximately 30% of the individuals infected by *Trypanosoma cruzi*. Chemokines may play an important role in cardiac damage observed in this pathology. DARC (Duffy Antigen / Receptor for Chemokine) can remove the excess of chemokine from sites of inflammation, and possibly reduce the damage caused by the exacerbated production of these mediators. **Objectives:** To determine the genotypic differences of DARC among *T. cruzi* seropositive individuals, with and without CCC, and then verify if there is an association of genotype with the disease severity, and to investigate the association between gender and age and the CCC. **Methods:** Seventy four patients with CCC and 21 individuals without cardiopathy were included in this study. Genotyping was performed by PCR-RFLP. Multiple logistic regression, Chi-square or Fisher's exact test were used in the statistical analysis. **Results:** The degrees of severe and moderate severity were more frequent in patients aged ≤ 60 years of age, $p = 0.0098$. The male gender was a predictor factor for CCC (OR = 3.87, 95% CI: 1.30-11.56; $p=0.015$). The genotypic differences between the CCC were not statistically significant. **Conclusion:** There was neither association between the genotypes evaluated and the CCC, nor with its severity. Patients aged less than or equal to 60 years of age presented an increased risk of developing the most severe forms of the cardiopathy, and male gender was associated with increased risk for CCC.

Keywords: Chagas disease, Chronic chagasic cardiomyopathy, DARC, Chemokines.

I. Introdução

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma doença parasitária endêmica na América Latina e estima-se que entre 15 e 17 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi*, nesta área.^{1,2} A Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) é o mais importante aspecto clínico desta parasitose, pois acomete entre 25% e 30% dos indivíduos parasitados pelo *T. cruzi*.³ A CCC é o resultado de um processo inflamatório, caracterizada pela presença de um grande número de células inflamatórias no miocárdio.⁴ Os principais mecanismos envolvidos na patogênese desta miocardite incluem: comprometimento do sistema nervoso autônomo (regulador das contrações cardíacas), alterações da microcirculação e danos teciduais resultantes da resposta imune.⁵

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada pela produção elevada de citocinas inflamatórias, entre elas, IL-12, TNF- α e IFN- γ , e das seguintes quimiocinas, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10.^{5,6} Na fase crônica é possível detectar níveis elevados de TNF- α e IFN- γ , sendo verificados também em pacientes com a forma indeterminada da infecção.⁵ A expressão elevada de algumas quimiocinas foi verificada em modelos animais e em humanos, os quais apresentavam a forma cardíaca da doença de Chagas. Um estudo recente realizado com cães, um modelo bem semelhante ao estudo da doença de Chagas humana, verificou a expressão elevada da quimiocina CCL5 em cães com a forma cardíaca da doença, quando comparados com aqueles que apresentavam a forma indeterminada.⁷ A expressão elevada de genes que codificam as quimiocinas CCL2, CCL8 e CCL7 foi observada no coração de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*.⁸ E ainda, a concentração da quimiocina CCL2 no

coração foi diretamente associada com a intensidade da miocardite aguda e crônica em camundongos (C3H/He) infectados com a cepa colombiana do *T. cruzi*.⁹

Em humanos, níveis plasmáticos elevados de CCL2 e TNF- α foram associados com a severidade da doença em pacientes com CCC, e esta última, foi diretamente correlacionada com o grau de disfunção cardíaca.¹⁰ A expressão de genes dos cardiomiócitos envolvidos no processo de hipertrofia patológica pode estar relacionada com IFN- γ e CCL2.¹¹ As quimiocinas inflamatórias desempenham importante papel na regulação da resposta imune, no entanto quando produzidas em excesso podem contribuir para lesões teciduais observadas em diversas patologias.^{4,12} Dados recentes sugerem que as citocinas inflamatórias e quimiocinas podem ser responsáveis pelos danos cardíacos observados na CCC.³

Os antígenos do sistema histo-sanguíneo Duffy são codificados pelos alelos *FYA* e *FYB*,¹³ os quais são expressos de forma codominante e diferem entre si pela substituição de uma base nitrogenada guanina por outra adenina no nucleotídeo 125, o que resulta em um polimorfismo comum na população caucasiana.¹⁴ Na região promotora do gene *FY*, pode ocorrer uma mutação pontual em que a timina é substituída pela citosina, resultando em uma variante do alelo *FYB* (*FYB-33*).^{15,16}

Os antígenos Fya e Fyb são expressos nos eritrócitos, em células de Purkinje do cerebelo, nas células epiteliais dos rins e dos pulmões, e ainda, na superfície de células endoteliais de vênulas e microvasos.^{13,17-22} Os indivíduos com fenótipo Fy (a-b-) não apresentam o antígeno Duffy em suas hemáceas, porém a expressão antigênica é mantida nos endotélios, a qual determina um importante papel na fisiopatologia da inflamação.^{17,20,23}

Os antígenos do sistema histo-sanguíneo Duffy são glicoproteínas transmembrânicas identificadas como receptores para quimiocinas e, por isso, denominadas DARC (*Duffy Antigen/ Receptor for Chemokine*).^{13,24-27} DARC é considerado um receptor promíscuo, pois interage com ambas as famílias de quimiocinas, CC e CXC, com alta afinidade e liga-se apenas às quimiocinas inflamatórias, entre elas as quimiocinas CCL2, CCL5 e CCL7.²⁶⁻³⁰

O antígeno Duffy pode estar envolvido na “varredura” do excesso de quimiocinas dos locais de inflamação, colaborando com a regulação dos níveis destes mediadores inflamatórios na circulação^{24,30} e, possivelmente, atenuando os danos causados pela produção exacerbada de quimiocinas. Além disso, diferenças nos níveis de expressão de DARC podem modular o curso de algumas doenças. De acordo com as evidências apresentadas, os objetivos deste estudo foram determinar se há diferenças no perfil genotípico de DARC entre indivíduos sororreagentes para *T. cruzi*, com e sem CCC e, nos últimos, verificar se há associação com os genótipos destes indivíduos e a severidade da doença, além de investigar se existe associação entre o gênero e idade dos indivíduos e a CCC. É importante ressaltar que nenhum estudo foi realizado a fim de investigar o perfil genotípico de DARC e a CCC.

II. Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa – CEP da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP sob número 3364/2008. Além disso, todos os participantes foram incluídos no estudo após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O presente estudo foi realizado com indivíduos sororreagentes para doença de Chagas, por Reação de Imunofluorescência (RIFI) e/ou Teste imunoenzimático (ELISA).

Os pacientes portadores de doença de Chagas, rotineiramente tratados no Ambulatório de Cardiomiopatia do Hospital de Base/ FUNFARME de São José do Rio Preto, foram considerados para o estudo. Todos os pacientes submeteram-se a avaliação clínica, eletrocardiograma e ecocardiograma, sendo considerados portadores de CCC os indivíduos que apresentavam alterações no eletrocardiograma basal ou no estudo ecocardiográfico. As alterações eletrocardiográficas indicativas de CCC foram as seguintes: 1) Bloqueio completo do ramo direito do feixe de His; 2) Bloqueio fascicular anterior esquerdo; 3) Bloqueio completo do ramo esquerdo; 4) Necrose e 5) ritmo de marca-passo artificial.

A alteração ecocardiográfica indicativa de CCC foi a fração de ejeção do ventrículo esquerdo $< 55\%$. Nos casos em que não houve condição técnica de diferenciação desta anormalidade, utilizou-se o critério fração de ejeção do ventrículo esquerdo $< 50\%$ obtido na cintilografia sincronizada das câmaras cardíacas. Os critérios utilizados para determinar o grau de severidade do comprometimento cardíaco dos pacientes com CCC foi o índice da Fração de Ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) detectada pelo ecocardiograma, além dos dados do resultado deste exame, bem como do eletrocardiograma. As FEVEs foram classificadas como normal ($\geq 55\%$), leve ($< 55\%$ e $\geq 45\%$), moderada ($< 45\%$ e $\geq 30\%$), ou grave ($< 30\%$), de conformidade com a “American Society of Echocardiography”.³¹

Este estudo foi realizado com 95 indivíduos, os quais foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo é constituído por 74 pacientes, que apresentavam a forma clínica de CCC. Enquanto que o segundo grupo foi de 21 indivíduos, com sorologia positiva para doença de Chagas, mas sem manifestações cardíacas detectáveis. Após a triagem dos pacientes, amostras de sangue (4,0 ml) foram coletadas de todos os indivíduos, enquanto que os dados demográficos e os resultados do ecocardiograma e eletrocardiograma foram inseridos em uma planilha do programa Excel 2003.

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de sangue periférico pelo método de Fenol-clorofórmio, segundo Pena et al., (1991),³² com modificações. A metodologia utilizada para identificar os alelos do sistema histo-sanguíneo Duffy foi a técnica de amplificação pela reação em cadeia da polimerase - Polimorfismos de Comprimentos de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP). A região promotora do gene *FY* foi amplificada utilizando-se os primers FYN1 (5'-CAA GGC CAG TGA CCC CCA TA-3') e reverso FYN2 (5'-CAT GGC ACC GTT TGG TTC AG-3') que flanqueiam a região GATA-Box. Para determinar o polimorfismo G125A do gene *FY* foram utilizados o primer FYAB1 (5'-TCC CCC TCA ACT GAG AAC TC-3') e reverso FYAB2 (5'-AAG GCT GAG CCA TAC CAG AC-3'), que flanqueiam o segmento de 392 pares de bases no éxon 2.³³

Para identificação da mutação na região promotora do gene *FY*, no nucleotídeo - 33, o produto da PCR foi submetido à restrição utilizando-se a enzima *StyI* e para determinar o polimorfismo G125A foi utilizada a enzima *BanI*. As condições de amplificação por PCR-RFLP foram realizadas conforme descrita por Castilho et al. (2004).³³

Na análise estatística foi utilizada análise descritiva dos dados e distribuição pelo gráfico Box-plot. As comparações foram feitas com o auxílio do teste exato de Fisher. As variáveis quantitativas contínuas com distribuição Gaussiana foram comparadas pelo teste T não pareado. Admitiu-se erro α de 5% sendo considerados significantes valores de $P \leq 0,05$. O teste de Regressão Logística Múltipla foi usado para determinar o efeito das variáveis no risco para a CCC, o qual incluiu a idade (referência: ≤ 60 anos, mediana dos dois grupos), sexo (referência: feminino) e os genótipos do gene *FY* combinados (referência: DARC^{+/+}).

III. Resultados

As frequências genótípicas do sistema histo-sanguíneo Duffy determinada por PCR/RFLP, das 95 amostras de sangue dos indivíduos do estudo (74 pacientes com CCC e 21 indivíduos sem manifestações cardíacas) estão representadas na Tabela 1. A maior frequência observada em ambos os grupos foi a do genótipo *FYA/FYB*, sendo 39,19% nos pacientes com CCC e 42,86% naqueles sem cardiopatia manifesta. Elevada frequência também foi verificada nos indivíduos com o genótipo homozigoto para o alelo *FYB*, 22,97% e 28,57% entre os pacientes e indivíduos sem a cardiopatia, respectivamente. Foi realizado o teste exato de Fisher, porém as diferenças dos genótipos de *FY* entre os dois grupos estudados não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

A distribuição das frequências genótípicas de *FY* dos pacientes com CCC, de acordo com o grau de severidade da miocardiopatia está sumarizada na Tabela 2. Pode-se observar que as frequências mais elevadas foram verificadas no grupo de pacientes com o genótipo *FYA/FYB*, destes, 54,54% apresentam o grau de severidade leve,

seguido de 43,75% para o moderado, 37,50% para o grave e 30,43% para o normal. Para a comparação entre as combinações dos graus de severidade (normal com leve) e, (moderado com grave) versus as combinações genóticas (apenas presença de dois alelos *FY* positivos) e (pelo menos a presença de um alelo *FY* negativo), foi realizado o teste exato de Fisher e não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Já as frequências dos demais genótipos de *FY* foram baixas.

Em relação à idade dos pacientes, esta variou entre 27 e 88 anos, com média de 59,49 anos e mediana de 60 anos. Para a análise da comparação entre o grau de severidade da CCC e a faixa etária, os pacientes foram divididos em dois grupos, um com graus de severidade normal e leve e outro com graus moderado e grave. Quanto à idade nestes dois grupos, elas foram divididas em idades ≤ 60 e > 60 anos. Os graus de severidade moderado e grave apresentaram-se mais frequentes em pacientes na faixa etária ≤ 60 anos. Esta associação foi determinada pelo teste exato de Fisher e mostrou-se estatisticamente significativa, ($p=0,0098$), Tabela 3.

Os dados demográficos (idades e sexos) e genótipos de DARC combinados (pacientes com a presença de dois alelos *FY* positivos e, pacientes com a presença de pelo menos um alelo *FY* negativo) foram utilizados para a verificação do risco de CCC, no modelo de regressão logística múltipla, o qual mostrou que o sexo masculino foi fator preditor para a CCC (OR= 3,87; IC 95%: 1,30-11,56; $p=0,015$). Não houve associação estatisticamente significativa entre as idades e os genótipos DARC dos indivíduos e pacientes, com o risco da CCC, Tabela 4.

IV. Discussão

A população brasileira é altamente heterogênea devido à miscigenação de diferentes etnias. Além disso, o fluxo migratório não foi uniforme nas diferentes regiões do país.³⁴⁻³⁶ Uma característica do sistema histo-sanguíneo Duffy é a distribuição diferencial de seus determinantes antigênicos entre grupamentos étnicos, por isso têm sido usado como marcadores da composição étnica.

O presente estudo foi baseado na hipótese de DARC estar envolvido na patogênese da doença de Chagas, particularmente na CCC, além da possibilidade de diferenças no perfil genotípico deste antígeno modular o curso da doença. De acordo com os nossos resultados, o genótipo *FYA/FYB* foi o mais prevalente na população estudada, tanto entre os indivíduos com CCC quanto naqueles que não apresentam manifestações cardíacas, seguido pelos genótipos *FYB/FYB*, *FYA/FYB-33*, *FYA/FYA* e *FYB/FYB-33*. (Tabela 1). As diferenças no perfil genotípico de DARC entre indivíduos sororreagentes para *T. cruzi*, com e sem CCC não foram estatisticamente significantes. Estudos prévios realizados no Brasil, um na região Amazônica e outro na cidade de Campinas no estado de São Paulo, também mostraram freqüências elevadas dos genótipos *FYA/FYB* e *FYB/FYB*, como foi verificado no nosso estudo.^{33,37} Entretanto, as combinações alélicas de *FYA*, *FYB* e *FYB-33* mostraram distribuição diferencial em relação à população da região Sudeste do país.³³

Detectamos baixa freqüência do genótipo Duffy negativo (*FYB-33/FYB-33*) entre os pacientes com CCC (2,70%) e indivíduos sororreagentes (4,76%). Como já bem demonstrado, a ausência do antígeno Fy em muitos grupos étnicos africanos e em seus descendentes, parece não exercer nenhum efeito deletério.³⁸ Esses indivíduos são homozigotos para a mutação de *FYB* na região GATA-box, que abole completamente a expressão do antígeno Duffy nos eritrócitos, mas não em células de outros tecidos.¹⁵

Genótipos com a presença do alelo (*FYB-33*) resultam na diminuição da expressão da proteína Duffy na superfície do eritrócito em 50%,^{39,40} o que demonstra a ação de efeito de dose do gene,^{40,41} que poderia limitar o papel de receptor de quimiocinas.

Embora não tenhamos tomado nenhuma medida qualitativa ou quantitativa da expressão da glicoproteína Duffy nesse estudo, verificamos que as frequências genótípicas de *FY* nos pacientes com CCC em relação ao grau de severidade da miocardiopatia foram maiores naqueles portadores do genótipo heterozigoto *FYA/FYB* do que nos homozigotos para os alelos *FYA* e *FYB*, em todos os graus desta cardiopatia. Não houve, no entanto, associação significativa entre os graus de severidade da CCC e os genótipos do gene *FY* (Tabela 2). Pesquisadores verificaram que indivíduos homozigotos para os alelos *FYA* e *FYB* expressam quantidade menor de DARC que os heterozigotos. Desta forma, é possível que os últimos ofereçam maior repertório de receptores para as possíveis variações que ocorrem nas ligações com as quimiocinas.⁴¹ As bases que fundamentam essa observação ainda não estão determinadas e os nossos resultados genóticos, em conjunto com a falta de estudos na literatura, não nos permitem fazer inferências de associação entre estes genótipos e a CCC.

Nossos resultados não apresentaram associação significativa entre o perfil genotípico de DARC e a CCC, talvez devido a limitações no tamanho amostral, porém há relatos na literatura que associam os genótipos Duffy com outras doenças. O antígeno Duffy está envolvido em doenças e transplantes renais, rejeição aguda do transplante e arterite de células gigantes.⁴²⁻⁴⁷ Estudos realizados com câncer de próstata sugerem que os indivíduos DARC $\bar{+}$ podem apresentar aumento da incidência e mortalidade para este tipo de câncer.^{48,49} A expressão de DARC pode atenuar o potencial de crescimento e metástase do carcinoma espinocelular de laringe e dos

cânceres de mama e pulmão.⁵⁰⁻⁵² Estudiosos verificaram que indivíduos DARC γ/γ apresentaram um aumento de 40% no risco de adquirir o HIV, embora eles apresentassem uma progressão mais lenta da doença.^{53,54}

Um estudo realizado na região Amazônica verificou que indivíduos com o genótipo *FYA/FYB* são mais susceptíveis à malária vivax e a presença do alelo *FYB-33* está relacionada com risco diminuído desta doença.³⁷ Um estudo posterior realizado na mesma região sugere que os genótipos *FYA/FYA* e *FYA/FYB* podem estar associados com o aumento da frequência de infecção por malária vivax e ainda com alta densidade parasitária, que não é comum nesta doença.⁵⁵

Nossas análises mostraram uma associação significativa ($p=0,0098$) entre pacientes na faixa etária menor ou igual a 60 anos com os graus de severidade moderado e grave combinados, indicando que estes indivíduos apresentam risco aumentado de desenvolver as formas mais graves da cardiopatia (Tabela 3). Nossos resultados não estão de acordo com a literatura, em que a severidade da cardiopatia aumenta em pacientes com idade avançada, porém há relatos de que a cardiopatia chagásica é predominante em indivíduos na faixa etária entre 30 e 60 anos.^{56,57} O presente estudo também mostrou que o sexo masculino foi fator preditor para a CCC (Tabela 4), corroborando com dados da literatura, os quais sugerem que a CCC predomina em indivíduos do sexo masculino.⁵⁶⁻⁵⁸

V. Conclusão

As diferenças no perfil genotípico de DARC entre indivíduos sororreagentes para *T. cruzi*, com e sem CCC não mostraram qualquer associação, e também não houve associação entre os genótipos dos pacientes e a severidade da CCC, o que pode ser

devido ao pequeno número amostral. Por outro lado, os pacientes na faixa etária menor ou igual a 60 anos apresentaram risco aumentado de desenvolver as formas mais graves da cardiopatia. E ainda, o sexo masculino foi fator preditor para a CCC.

DARC está envolvido em diversas patologias e diferenças na expressão deste receptor podem resultar na diversidade do curso de algumas doenças, além de susceptibilidade diferencial às mesmas. Apesar do conhecimento atual sobre a relação entre estrutura/função e localização tecidual deste receptor, o papel funcional das diferentes combinações genótípicas necessita de maiores esclarecimentos, uma vez que estas diferenças no genótipo podem refletir nos mecanismos genéticos favoráveis à susceptibilidade a doenças infecciosas. Assim, são necessários novos estudos a fim de investigar o real papel de DARC na patogênese da doença de Chagas e na CCC.

VI. Agradecimentos

Somos gratos à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

VII. Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

VIII. Suporte financeiro

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências Bibliográficas

1. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 2010;115:5-13.
2. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375:1388-402.
3. Cunha-Neto E, Teixeira PC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmun Rev* 2011;10:163-5.
4. Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol* 2009;31:673-85.
5. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC et. al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:252-8.
6. Bilate AM; Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50:67-74.
7. Guedes PM, Veloso VM, Talvani A, Diniz LF, Caldas IS, Do-Valle-Matta MA et al. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;138:106-13.

8. Soares MB, de Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, dos Santos RR et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2010;202:416-26.
9. Lannes-Vieira J, Silverio JC, Pereira IR, Vinagre NF, Carvalho CM, Paiva CN et. al. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors--how to make a dream come true. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:226-35.
10. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 2004;38:943-50.
11. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML et. al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* 2005;167:305-13.
12. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000;18:593-620.
13. Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood* 1997;89:3077-91.

14. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:10793-7.
15. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. Nat Genet 1995;10:224-8.
16. Iwamoto S, Li J, Omi T, Ikemoto S, Kajii E. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. Blood 1996;87:378-85.
17. Hadley TJ, Lu ZH, Wasniowska K, Martin AW, Peiper SC, Hesselgesser J et. al. Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. J Clin Invest 1994;94:985-91.
18. Chaudhuri A, Nielsen S, Elkjaer ML, Zbrzezna V, Fang F, Pogo AO. Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs. Blood 1997;89:701-12.
19. Horuk R, Martin AW, Wang Z, Schweitzer L, Gerassimides A, Guo H et. al. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. J Immunol 1997;158:2882-90.
20. Peiper SC, Wang ZX, Neote K, Martin AW, Showell HJ, Conklyn MJ et. al. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells

- of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J Exp Med* 1995;181:1311-7.
21. Girard JP, Bækkevold ES, Yamanaka T, Haraldsen G, Brandtzaeg P, Amalric F. Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am J Pathol* 1999;155:2043-55.
22. Rot A. Contribution of Duffy antigen to chemokine function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:687-94.
23. Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Br J Haematol* 1995;90:823-9.
24. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hébert CA, Valente AJ et. al. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest* 1991;88:1362-9.
25. Neote K, Darbonne W, Ogez J, Horuk R, Schall TJ. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *J Biol Chem* 1993;268:12247-9.
26. Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ et. al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993;261:1182-4.

27. Horuk R, Wang ZX, Peiper SC, Hesselgesser J. Identification and characterization of a promiscuous chemokine-binding protein in a human erythroleukemic cell line. *J Biol Chem* 1994;269:17730-3.
28. Gardner L, Patterson AM, Ashton BA, Stone MA, Middleton J. The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:306-12.
29. Comerford I, Nibbs RJ. Post-translational control of chemokines: a role for decoy receptors?. *Immunol Lett.* 2005; 31;96:163-74.
30. de Brevern AG, Autin L, Colin Y, Bertrand O, Etchebest C. In silico studies on DARC. *Infect Disord Drug Targets* 2009; 9:289-303.
31. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18:1440-63.
32. Pena SD, Macedo AM, Gontijo NF, Medeiros AM, Ribeiro JC. DNA bioprints: simple nonisotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis* 1991;12:146-52.
33. Castilho L, Rios M, Pellegrino Jr J, Saad STO, Costa FF, Reid MR. A novel Fy allele in Brazilians. *Vox Sang* 2004; 87:190-5.

34. Azevedo ES, Silva KM, Silva MC, Lima AM, Fortuna CM, Santos MG. Genetic and anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil. *Hum Hered* 1981; 31:350-357.
35. Franco MHL, Weimer TA, Salzano FM. Blood polymorphisms and racial admixture in two Brazilian populations. *Am J Phys Anthropol* 1982; 58:127-132.
36. Zago MA, Costa FF, Tone LG, Bottura C. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum Hered* 1983; 33: 125-129.
37. Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, Moretti LJ et al. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 2007;6:167.
38. Pogo AO, Chaudhuri A. The Duffy protein: A malarial and chemokine receptor. *Semin Hematol* 2000;37:122-129.
39. Yazdanbakhsh M, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transf* 2000;40:310-320.
40. Michon P, Wooley I, Wood EM, Kastens W, Zimmerman PA, Adams JH. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the P. vivax ligand required for blood-stage infection. *FEBS Letters* 2001; 495:111-14.
41. Woolley IJ, Hotmire KA, Sramkoski RM, Zimmerman PA, Kazura JW: Differential expression of the Duffy antigen receptor for chemokines according to RBC age and FY genotype. *Transf* 2000, 40:949-953.

-
42. Liu XH, Hadley TJ, Xu L, Peiper SC, Ray PE. Up-regulation of Duffy antigen receptor expression in children with renal disease. *Kidney Int* 1999;55:1491-500.
43. Segerer S, Regele H, MacK M, Kain R, Cartron JP, Colin Y et. al. The Duffy antigen receptor for chemokines is up-regulated during acute renal transplant rejection and crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 2000;58:1546-56.
44. Segerer S, Cui Y, Eitner F, Goodpaster T, Hudkins KL, Mack M et. al. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *Am J Kidney Dis* 2001;37:518-31.
45. Segerer S, Böhmig GA, Exner M, Colin Y, Cartron JP, Kerjaschki D et. al. When renal allografts turn DARC. *Transplantation* 2003;75:1030-4.
46. Brühl H, Vielhauer V, Weiss M, Mack M, Schlöndorff D, Segerer S. Expression of DARC, CXCR3 and CCR5 in giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:309-13.
47. Vielhauer V, Allam R, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Draganovici D, Mandelbaum J et al. Efficient renal recruitment of macrophages and T cells in mice lacking the duffy antigen/receptor for chemokines. *Am J Pathol* 2009;175:119-31.
48. Lentsch AB. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) and prostate cancer. A role as clear as black and white?. *FASEB J* 2002;16:1093-5.

49. Shen H, Schuster R, Stringer KF, Waltz SE, Lentsch AB. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth. *FASEB J* 2006;20:59-64.
50. Addison CL, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM. Overexpression of the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) by NSCLC tumor cells results in increased tumor necrosis. *BMC Cancer* 2004;4:14-28.
51. Wang J, Ou ZL, Hou YF, Luo JM, Shen ZZ, Ding J et. al. Enhanced expression of Duffy antigen receptor for chemokines by breast cancer cells attenuates growth and metastasis potential. *Oncogene* 2006;25:7201-11.
52. Sun G, Wang Y, Zhu Y, Huang C, Ji Q. Duffy antigen receptor for chemokines in laryngeal squamous cell carcinoma as a negative regulator. *Acta Otolaryngol* 2011;131:197-203.
53. He W, Neil S, Kulkarni H, Wright E, Agan BK, Marconi VC et. al. Duffy antigen receptor for chemokines mediates trans-infection of HIV-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS susceptibility. *Cell Host Microbe* 2008;4:52-62.
54. Horne K, Woolley IJ. Shedding light on DARC: the role of the Duffy antigen/receptor for chemokines in inflammation, infection and malignancy. *Inflamm Res* 2009;58:431-5.
55. Albuquerque SR, Cavalcante Fde O, Sanguino EC, Tezza L, Chacon F, Castilho L et al. FY polymorphisms and vivax malaria in inhabitants of Amazonas State, Brazil. *Parasitol Res* 2010;106:1049-53.

56. Rassi A Jr, Rassi A, Rassi SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation* 2007;115:1101-8.
57. Hidron AI, Gilman RH, Justiniano J, Blackstock AJ, Lafuente C, Selum W et al. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e688.
58. Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Omelianiuk M, Guzmán S, Moreno Barral J et al. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Heart* 2003;89:1186-90.

Tabela 1: Frequências genótípicas e alélicas de *FY* em pacientes com CCC e indivíduos sem manifestações cardíacas, atendidos no ambulatório de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital de Base – FUNFARME.

Sororreagentes				
Genótipos	Sem CCC	Com CCC	p	OD (IC 95%)
	n(%)	n(%)		
<i>FYA/FYA</i>	2(9,52)	7(9,46)	1,000	1,008 (0,193-5,259)
<i>FYA/FYB-33</i>	2(9,52)	11(14,86)	0,726	0,603 (0,122-2,962)
<i>FYA/FYB</i>	9(42,86)	29(39,19)	0,804	1,164 (0,435-3,109)
<i>FYB/FYB</i>	6(28,57)	17(22,97)	0,577	1,341 (0,450-3,993)
<i>FYB/FYB-33</i>	1(4,76)	8(10,81)	0,678	0,412 (0,048-3,502)
<i>FYB-33/FYB-33</i>	1(4,76)	2(2,70)	0,532	1,800 (0,155-20,893)
Alelos	Frequências alélicas			
<i>FYA</i>	0,357	0,365	1,000	0,967 (0,473-1,976)
<i>FYB</i>	0,524	0,480	0,727	1,193 (0,600-2,369)
<i>FYB-33</i>	0,119	0,155	0,632	0,734 (0,261-2,067)

Teste Exato de Fisher.

Tabela 2: Frequências genóticas de *FY* entre os diferentes graus de severidade da CCC dos pacientes atendidos no ambulatório de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital de Base – FUNFARME.

Genótipos	Severidade da CCC			
	Normal n(%)	Leve n(%)	Moderada n(%)	Grave n(%)
<i>FYA/FYA</i>	2(8,69)	1(9,09)	1(6,25)	3(12,50)
<i>FYA/FYB-33</i>	5(21,74)	0	2(12,50)	4(16,67)
<i>FYA/FYB</i>	7(30,43)	6(54,54)	7(43,75)	9(37,50)
<i>FYB/FYB</i>	3(13,04)	2(18,18)	5(31,25)	7(29,17)
<i>FYB/FYB-33</i>	5(21,74)	2(18,18)	0	1(4,17)
FYB-33FYB-33	1(4,35)	0	1(6,25)	0
Total	23(100,00)	11(100,00)	16(100,00)	24(100,00)

Tabela 3: Frequências dos graus de severidade da CCC entre os pacientes com faixas etárias menor ou igual a 60 e maior que 60 anos de idade atendidos no ambulatório de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular do Hospital de Base – FUNFARME.

Faixa etária	Severidade da Cardiopatia				Total
	Normal	Leve	Moderada	Grave	
≤ 60 anos	7(20,59%)	3(8,82%)	8(23,53%)	16(47,06%)	34(100%)
> 60 anos	16(40,00%)	8(20,00%)	8(20,00%)	8(20,00%)	40(100%)

Teste exato de Fisher, p= 0,0098

Tabela 4. Dados demográficos e frequência de DARC nos cardiopatas e sororreagentes para o *T. cruzi*.

Variáveis	Cardiopatas n (%)	Sem cardiopatia n (%)	OR (IC 95%)	P
Idade				
Mediana				
≤ 60 anos	34(45,94)	8(38,09)	Referência	
> 60 anos	40(54,05)	13(61,90)	0,67 (0,24-1,90)	0,450
Sexo				
Feminino	32(43,24)	15(71,43)	Referência	
Masculino	42(56,76)	6(28,57)	3,87 (1,30-11,56)	0,015
DARC				
Positivos	53 (71,62)	17 (80,95)	Referência	
Negativos	21 (28,38)	4 (19,05)	2,31 (0,65-8,21)	0,197

3. CONCLUSÕES

3. Conclusões

1. Não houve associação significativa entre o polimorfismo G125A no éxon 2 e a mutação T-33C na região promotora do gene *FY* com os indivíduos sororreagentes para *T. cruzi*, com e sem Cardiopatia Chagásica Crônica.
2. O polimorfismo G125A no éxon 2 e a mutação T-33C na região promotora do gene *FY* não apresentaram associação significativa com os graus de severidade da Cardiopatia Chagásica Crônica.
3. O sexo masculino foi fator preditor para a Cardiopatia Chagásica Crônica e os pacientes na faixa etária menor ou igual a 60 anos apresentaram risco aumentado de desenvolver as formas mais graves da cardiopatia.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. Referências Bibliográficas

1. Donahue RP, Bias WB, Renwick JH, McKusick VA. Probable assignment of the Duffy blood group locus to chromosome 1 in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61:949-55.
2. Iwamoto S, Li J, Omi T, Ikemoto S, Kajii E. Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium. *Blood* 1996;87:378-85.
3. Chaudhuri A, Polyakova J, Zbrzezna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO. Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the Plasmodium vivax malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10793-7.
4. Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 1995;10:224-8.
5. Hadley TJ, Peiper SC. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood* 1997;89:3077-91.
6. Race RR, Sanger R. *Blood Groups in Man*. 6nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1975.
7. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 10nd ed. Oxford: Blackwell Science; 1997.

8. Hadley TJ, Lu ZH, Wasniowska K, Martin AW, Peiper SC, Hesselgesser J et. al. Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. *J Clin Invest* 1994;94:985-91.
9. Chaudhuri A, Nielsen S, Elkjaer ML, Zbrzezna V, Fang F, Pogo AO. Detection of Duffy antigen in the plasma membranes and caveolae of vascular endothelial and epithelial cells of nonerythroid organs. *Blood* 1997;89:701-12.
10. Horuk R, Martin AW, Wang Z, Schweitzer L, Gerassimides A, Guo H et. al. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol* 1997;158:2882-90.
11. Peiper SC, Wang ZX, Neote K, Martin AW, Showell HJ, Conklyn MJ et. al. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J Exp Med* 1995;181:1311-7.
12. Girard JP, Baekkevold ES, Yamanaka T, Haraldsen G, Brandtzaeg P, Amalric F. Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am J Pathol* 1999;155:2043-55.
13. Rot A. Contribution of Duffy antigen to chemokine function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:687-94.
14. Mallinson G, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the

- Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Br J Haematol* 1995;90:823-9.
15. Lewis Jr GE, Miller LH, Ibrahim L, Wong PW, McGinniss M, Ooi WL. Duffy phenotypes in Malaysian populations: correction of previous unusual findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 509-10.
16. Pogo AO, Chaudhuri A. The Duffy protein: A malarial and chemokine receptor. *Semin Hemat* 2000; 37:122-9.
17. Mourant A, Kopec A, Domaniewska-Sobczak K. The Distribution of the Human Blood Groups and Other Polymorphisms. 2nd ed. London: Oxford University Press; 1976.
18. Castilho L, Rios M, Pellegrino Jr J, Saad STO, Costa FF, Reid MR. A novel Fy allele in Brazilians. *Vox Sang* 2004; 87:190-5.
19. Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hébert CA, Valente AJ et. al. Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest* 1991;88:1362-9.
20. Neote K, Darbonne W, Ogez J, Horuk R, Schall TJ. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *J Biol Chem* 1993;268:12247-9.
21. Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ et. al. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993;261:1182-4.

22. Horuk R, Wang ZX, Peiper SC, Hesselgesser J. Identification and characterization of a promiscuous chemokine-binding protein in a human erythroleukemic cell line. *J Biol Chem* 1994;269:17730-3.
23. Gardner L, Patterson AM, Ashton BA, Stone MA, Middleton J. The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:306-12.
24. de Brevern AG, Autin L, Colin Y, Bertrand O, Etchebest C. In silico studies on DARC. *Infect Disord Drug Targets* 2009; 9:289-303.
25. Comerford I, Nibbs RJ. Post-translational control of chemokines: a role for decoy receptors?. *Immunol Lett.* 2005; 31;96:163-74.
26. Pruenster M, Mudde L, Bombosi P, Dimitrova S, Zsak M, Middleton J et. al. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol* 2009;10:101-8.
27. Reutershan J, Harry B, Chang D, Bagby GJ, Ley K. DARC on RBC limits lung injury by balancing compartmental distribution of CXC chemokines. *Eur J Immunol* 2009;39:1597-607.
28. Smolarek D, Bertrand O, Czerwinski M, Colin Y, Etchebest C, de Brevern AG. Multiple interests in structural models of DARC transmembrane protein. *Transfus Clin Biol.* 2010;17:184-96.
29. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000;18:593-620.

30. Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol* 2009;31:673-85.
31. Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala F. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:115-9.
32. Ramirez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Lages-Silva E. First evidence of *Trypanosoma rangeli* in the southeast of Brasil, an endemic region to Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31:99-102.
33. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375:1388-402.
34. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 2010;115:5-13.
35. Lana M, Tafuri WL. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA, editores. *Parasitologia Humana*. 11^a ed. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 85-108.
36. <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
37. Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years?. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010;52:300-16.

-
38. Cunha-Neto E, Teixeira PC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. Myocardial gene and protein expression profiles after autoimmune injury in Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmun Rev* 2011;10:163-5.
39. Pereira Barretto AC, Mady C, Arteaga-Fernandez E, Stolf N, Lopes EA, Higuchi ML et. al. Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. *Am Heart J* 1986;111:307-12.
40. Higuchi ML, De Morais CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G 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* 1987;10:665-70.
41. Muratore CA, Baranchuk A. Current and emerging therapeutic options for the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy. *Vasc Health Risk Manag* 2010;6:593-601.
42. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC et. al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:252-8.
43. Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J et. al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993;423:157-60.

-
44. Brodskyn CI, Barral-Netto M. Resposta Imune Humana na Doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, editores. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 170-6.
45. Bilate AM; Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50:67-74.
46. Guedes PM, Veloso VM, Talvani A, Diniz LF, Caldas IS, Do-Valle-Matta MA et al. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;138:106-13.
47. Soares MB, de Lima RS, Rocha LL, Vasconcelos JF, Rogatto SR, dos Santos RR et al. Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J Infect Dis* 2010;202:416-26.
48. Lannes-Vieira J, Silverio JC, Pereira IR, Vinagre NF, Carvalho CM, Paiva CN et al. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors--how to make a dream come true. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104:226-35.
49. Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis* 2004;38:943-50.

-
50. Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatou D, Benvenuti L, Higuchi ML et. al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* 2005;167:305-13.
51. Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 1975;189:561-3.
52. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 1976;295:302-4.
53. Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Dunton RF, Mtalib R, Koros J et. al. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:575-81.
54. Cavasini CE, de Mattos LC, Couto AA, Couto VS, Gollino Y, Moretti LJ et. al. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. *Malar J* 2007;6:167.
55. Sun G, Wang Y, Zhu Y, Huang C, Ji Q. Duffy antigen receptor for chemokines in laryngeal squamous cell carcinoma as a negative regulator. *Acta Otolaryngol* 2011;131:197-203.
56. Lentsch AB. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) and prostate cancer. A role as clear as black and white?. *FASEB J* 2002;16:1093-5.
57. Shen H, Schuster R, Stringer KF, Waltz SE, Lentsch AB. The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth. *FASEB J* 2006;20:59-64.

58. He W, Neil S, Kulkarni H, Wright E, Agan BK, Marconi VC et. al. Duffy antigen receptor for chemokines mediates trans-infection of HIV-1 from red blood cells to target cells and affects HIV-AIDS susceptibility. *Cell Host Microbe* 2008;4:52-62.
59. Horne K, Woolley IJ. Shedding light on DARC: the role of the Duffy antigen/receptor for chemokines in inflammation, infection and malignancy. *Inflamm Res* 2009;58:431-5.

5. APÊNDICES

Anexo I



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – FAMERP.
FUNDAÇÃO FACULDADE REGIONAL DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – FUNFARME.
TERMO DE PARTICIPAÇÃO E CONSENTIMENTO



“Caracterização dos genótipos de *Trypanosoma cruzi* em pacientes com miocardiopatia chagásica atendidos no HB/FUNFARME – Noroeste Paulista”

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa para identificar o agente causador da Doença de Chagas em pacientes com miocardiopatia chagásica atendidos aqui no HB/FUNFARME.

A doença de Chagas é uma doença endêmica no Brasil e nas Américas do Norte, Sul e Central. Sendo uma parasitose tecidual e sanguínea. O agente etiológico (causador) da Doença de Chagas é o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido ao homem e a outros mamíferos suscetíveis por hemípteros hematófagos (insetos chamados popularmente de barbeiro) da subfamília Triatominae. Essa doença apresenta um curso clínico variável e pode incluir uma fase aguda e uma fase crônica, separadas por um período indeterminado (neste os pacientes são relativamente assintomáticos), nesta fase da doença, o *T. cruzi* se concentra nas fibras musculares. A fase aguda caracteriza-se por alta parasitemia e parasitismo tecidual, que pode ser sintomática (febre, linfadenomegalia, miocardite e falência cardíaca) ou mais freqüentemente assintomática. Geralmente essa primoinfecção ocorre na infância e não é fatal nessa fase.

Este projeto tem como objetivo investigar a ocorrência das variantes genéticas do *T. cruzi* em pacientes com miocardiopatia chagásica atendidos neste hospital (HB) no Noroeste Paulista para desenvolver metodologias diagnósticas precisas para detectar precocemente possível reativação da DC e implantar medidas terapêuticas adequadas e efetivas, além de obter importantes informações sobre o desenvolvimento da doença. Sua participação é de fundamental importância nesse estudo e consistirá em:

1º- Responder um questionário sobre seus hábitos de vida, garantindo-lhe sigilo de todas as suas informações pessoais;

2º- Será coletado 10 ml de seu sangue para exame da DC, que será destinado apenas para a análise científica e não poderá ser comercializado. Este processo consiste em introduzir uma agulha na veia e neste momento você, conforme sua sensibilidade, poderá sentir uma ardência. Após a coleta de sangue, poderá apresentar um hematoma (roxo) no local que foi introduzido a agulha.

Esclarecemos que não haverá riscos de qualquer tipo de contaminação nesta coleta, pois o material utilizado será individual e não contaminado, isto é, um material estéril (seringa, agulha, algodão com álcool) para cada pessoa, e que depois será colocado em saco de lixo e descartado em local seguro.

De acordo com as recomendações que resultaram da Conferência Internacional de Helsinque (1964) e Tóquio (1975), o presente termo de participação e consentimento apenas confirma sua aprovação, autorização e colaboração ao estudo proposto, em obediência à portaria 196/96 do Ministério da Saúde do Brasil.

Declaro para os devidos fins que fui suficientemente esclarecido(a) sobre minha participação voluntária no projeto “Caracterização dos genótipos do *Trypanosoma cruzi* em pacientes com miocardiopatia chagásica atendidos no HB/FUNFARME – Noroeste” e que, se me sentir prejudicado, a qualquer momento, poderei solicitar a retirada das minhas informações do mesmo, tendo à minha disposição as formas de contato com o pesquisador.

..... de de

Pesquisador Responsável
Prof. Dr. Carlos E. Cavasini
CIM/DDIP - FAMERP
FONE: (0xx17) 3201-5736 / 3201.5918
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro
São José do Rio Preto – SP - 15090-000

Sujeito da pesquisa – RG: _____



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – FAMERP.
 FUNDAÇÃO FACULDADE REGIONAL DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – FUNFARME.
 FICHA EPIDEMIOLÓGICA



“Caracterização dos genótipos de *Trypanosoma cruzi* em pacientes com miocardiopatia chagásica atendidos no HB/FUNFARME – Noroeste Paulista”

No. Prontuário:	Data da coleta: ____/____/____	Código do projeto: SR () / DCC () / TR ()
-----------------	--------------------------------	--

DADOS PESSOAIS

Nome: _____ DN: ____/____/____ Idade: _____ Anos de Escolaridade (_____)

HISTÓRICO DE MORADIAS

LN:	MUNICÍPIO	UF	ZONA	TIPO MORADIA	Tempo	Ocupação
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		
MA:			R () / U ()	Alv () / Mad () / Taipá () / Outra ()		

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS					
Quiviu falar ou conhece o bicho Barbero?			Conhece ou conheceu alguma pessoa com DC?		
Sim () / Não ()	Desde Quando? (tempo):		Sim () / Não ()	Grau de parentesco	
Recebeu transfusão de sangue: Sim () / Não ()			Quando?	Por que?	
Tabagismo: Sim () / Não ()		Há quanto tempo?	Deixou de fumar a quanto tempo?		Por que?
Etilismo: Sim () / Não ()		Há quanto tempo?	Deixou de beber a quanto tempo?		Por que?
DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS					
Data do diagnóstico do parasitismo? Ano			Tipo de Exame:		
Data do diagnóstico clínico (médico)? Ano			Exames complementares:		
Tempo entre diagnóstico laboratorial e clínico?			Faz tratamento? Sim () / Não ()		Quando tempo?
Tipo de tratamento?					

São José do Rio Preto, de de 20__

.....
 Coletor de dados

 Pesquisador Responsável:
 Prof. Dr. Carlos E. Cavasini - CIM/DDIP - FAMERP
 FONE: (0xx17) 3201-5736 / 3201.5918
 Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro
 São José do Rio Preto - SP - 15090-000

6. ANEXOS

**FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 274/2008

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 3364/2008 sob a responsabilidade de Carlos Eugênio Cavasini com o título "Caracterização dos genótipos de Trypanosoma cruzi em pacientes com miocardiopatia chagásica atendidos no HB/FUNFARME - Noroeste Paulista" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 21 de julho de 2008.

Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto tomou ciência e aprovou a **ampliação da metodologia conforme encaminhamento datado de 17 de maio de 2010**; referente ao protocolo n.º 3364/2008 sob a responsabilidade de Carlos Eugênio Cavasini com o título "Caracterização dos genótipos de *Trypanosoma cruzi* em pacientes com miocardiopatia chagásica atendidos no HB/FUNFARMÉ - Noroeste Paulista".

São José do Rio Preto, 24 de maio de 2010.


Prof. Dr. Antônio Carlos Pines
Coordenador do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA