



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

Amanda Priscila de Oliveira

Variantes Genéticas de *CCR5* e Concentrações
Plasmáticas das Quimiocinas *CCL3* e *CCL4* na
Doença de Chagas Crônica

São José do Rio Preto
2015

Amanda Priscila de Oliveira

**Variantes Genéticas de *CCR5* e Concentrações
Plasmáticas das Quimiocinas *CCL3* e *CCL4* na
Doença de Chagas Crônica**

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini

São José do Rio Preto
2015

Oliveira, Amanda Priscila
Variantes Genéticas de *CCR5* e Concentrações Plasmáticas das
Quimiocinas CCL3 e CCL4 na Doença de Chagas Crônica.
São José do Rio Preto, 2015
111 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
– FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini

1. Doença de Chagas; 2. *Trypanosoma cruzi*; 3. CCR5; 4. Quimiocina
CCL3; 5. Quimiocina CCL4.

AMANDA PRISCILA DE OLIVEIRA

**Variantes Genéticas de *CCR5* e Concentrações
Plasmáticas das Quimiocinas *CCL3* e *CCL4* na
Doença de Chagas Crônica**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de
Mattos

2º Examinador: Prof. Dr. Irineu Luiz Maia

3º Examinador: Profa. Dra. Maria Tercilia Vilela de
Azeredo Oliveira

4º Examinador: Profa. Dra. Lilian Castiglioni

5º Examinador: Profa. Dra. Heloisa S. Paro Pedro

Suplentes: Prof. Dr. Aldenis Albaneze Borim

Profa. Dra. Ana Livia Silva Galbiatti

São José do Rio Preto, 09 /09/2015.

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	iv
Epígrafe.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xiii
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xviii
1. Introdução.....	01
1.1 Doença de Chagas.....	02
1.2 Resposta imune contra o <i>T. cruzi</i>	07
1.3 Mecanismos envolvidos na patogênese da doença.....	09
1.4 Quimiocinas, receptor para quimiocinas CCR5, polimorfismos <i>CCR5</i> Δ 32 (rs333) e <i>CCR5</i> 59029 A/G (rs1799987).....	11
1.5 CCR5 e seus ligantes na doença de Chagas.....	12
1.6 Objetivos.....	13
2. Artigos	15
Artigo 1. <i>CCR5 chemokine receptor gene</i> variants in chronic Chagas' disease	18
Artigo 2. Genetic susceptibility to cardiac and digestive clinical forms of chronic Chagas disease: involvement of the <i>CCR5</i> 59029 A/G polymorphism.....	22
Artigo 3. O papel de CCR5 na doença de Chagas – uma revisão sistemática...	48
Artigo 4. Concentrações plasmáticas de CCL3 e CCL4 nas formas clínicas	

digestiva e cardíaca da doença de Chagas crônica.....	72
3. Conclusões.....	95
4. Referências Bibliográficas.....	97
5. Apêndices.....	107
5.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	108
5.2 Ficha de Dados Epidemiológicos.....	109
6. Anexos.....	110
6.1 Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa.....	111

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus e às pessoas mais importantes da minha vida:

A Deus

Acima de tudo. Pela presença constante em minha vida. Por guiar meus passos. Por sempre ter me auxiliado em todas as fases da execução deste trabalho. Por não me deixar desistir. Pela força em todos os momentos e principalmente nos momentos mais difíceis. Por me fazer acreditar que sou capaz. E também, ao meu anjo guardião por estar comigo o tempo todo, pelo auxílio, pelo amor incondicional, por guiar a minha vida, por não desistir de mim nunca...

À minha mãe Sueli

À pessoa mais importante da minha vida. Quero agradecer por todos os ensinamentos, pelo amor incondicional, por estar sempre presente na minha vida. Pelos conselhos, pela força nos momentos de dificuldade. Por acreditar em mim. Pela educação que me deu. Pelos momentos difíceis que superamos juntas. Pela amizade, pelo companheirismo. Pelos valores pessoais, por me ensinar o caminho do bem. Por tudo que você renunciou e já fez por mim. Pela sabedoria. Por toda dedicação, e simplesmente por ser essa pessoa maravilhosa exemplo de mãe e mulher... Eu a amo muito.

Ao meu pai Astolfo

Pelo exemplo de bondade, simplicidade e humildade. Quero agradecer por ser meu pai, pelo carinho, por todo auxílio. Mesmo longe, você sempre está nos meus pensamentos e no meu coração. Agradeço a Deus por tudo que superamos.

Ao meu pai Hélcio

Por me acolher como filha. Pelo exemplo de honestidade. Obrigada pelos ensinamentos, pela convivência, por estar sempre presente nos momentos de alegria e tristeza, por tudo que já fez por mim, e simplesmente por fazer parte da minha vida...

Ao meu namorado Flávio

Presente de Deus na minha vida. Você é uma pessoa maravilhosa, que admiro muito, principalmente pelas virtudes e valores pessoais. Quero agradecer por me amar exatamente como sou, com todas as minhas qualidades e defeitos. Pela paciência e compreensão. Por estar ao meu lado sempre, dividindo as alegrias e tristezas. Pela força nos momentos difíceis, por sempre me mostrar o lado bom dos acontecimentos. Por nunca duvidar da minha capacidade. Obrigada por tornar a minha vida mais alegre e mais bonita. Amo você.

À minha Avó Tereza

Exemplo de vida e sabedoria. Querida e admirada por todos. Lutou muito para cuidar de toda a família. Obrigada pelo amor incondicional. Por ter cuidado de mim, por todos os ensinamentos, conselhos e valores morais. A senhora sabe que representa muito mais do que uma avó para mim. Eu a amo muito.

À minha tia Terezinha

Exemplo de bondade. Sempre disposta a auxiliar as pessoas. Nunca poupou esforços para me ajudar. Quero agradecer pelo apoio, incentivo e por acreditar que sou capaz. Obrigada pelo carinho, boa vontade e por tudo que já fez por mim. É bem mais que uma tia, sendo muito importante na minha vida.

Aos meus irmãos

Júlia e Rafaela minhas irmãzinhas queridas. Vocês alegram e iluminam a minha vida. Vocês são muito importantes na minha vida. Aos meus irmãos de coração: à Aline, o Wellington e o Thalys. Aline obrigada por me auxiliar sempre que precisei, pela convivência, pelo carinho e por fazer parte da minha vida. Wellington apesar de distante, nunca nos esquecemos de você. Agradeço por fazer parte da minha vida também. Thalys meu irmãozinho querido. Você é muito especial e encanta a todos pelo modo de ser. Você também é muito importante para mim.

Agradecimentos

A Deus

Por tudo. Pela força, proteção e auxílio na realização deste trabalho. Sem Ele nada seria possível.

À minha mãe Sueli, meu pai Hélcio, meu pai Astolfo, meu namorado Flávio, minha Avó Tereza, minha tia Terezinha e aos meus irmãos

Obrigada pelo carinho, apoio, incentivo, força nos momentos difíceis e por acreditarem no meu potencial.

À toda a minha família

À minha avó Geni e ao meu avô Astolfo quero agradecer pelos ensinamentos, pelo carinho, pelo auxílio e por fazerem parte da minha vida. Ao meu tio Aparecido, minha tia Bela, meu tio José Antônio, minha tia Lourdes, meu tio Sebastião e meu primo Ednaldo pelo apoio, incentivo, pelo carinho e por estarem sempre presentes na minha vida. À minha priminha Maria Eduarda por ser tão especial, pelo carinho, por me alegrar, pela presença constante em minha vida. Ao Augusto César pelo carinho e por fazer parte de nossas vidas. Quero agradecer a Andresa e ao Ed Carlos pelo apoio, incentivo e carinho. Ao Heitor e a Isabela por alegrarem nossas vidas. Quero agradecer a Juliana pelo carinho, compreensão e todo o auxílio quando precisei. À dona Geni por ser essa pessoa maravilhosa, pela bondade, atenção, pelo carinho e compreensão. Ao meu sobrinho Rafael por me alegrar e fazer parte da minha vida. À minha passarinha Nina pelo carinho e por alegrar a minha vida, e à minha jabuti July por fazer parte da minha vida. Quero agradecer à Érica, à Joana, à Marina, ao Seu

Alicio, ao Tonny, ao Felipe e a todos os meus familiares pelo carinho, pelo apoio, pela força nos momentos difíceis e por me incentivarem a realizar os meus sonhos.

À FAMERP

Pela oportunidade e suporte financeiro à parte do projeto.

Ao Diretor Geral da FAMERP Prof. Dr. Dulcimar Donizeti de Souza

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FAMERP, ao Diretor Adjunto de Pós-Graduação: Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da FAMERP, seus coordenadores: Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira e Prof. Dr. Mário Abbud Filho

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação

Pela atenção durante o desenvolvimento deste trabalho. Quero agradecer ao Bruno, Luís Henrique e Fabiana. Quero agradecer em especial ao José Antônio, por sempre estar disposto a nos auxiliar no que for necessário.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

Pela oportunidade concedida, pela paciência e compreensão. Pelo estímulo à pesquisa e crescimento profissional. Por todos os ensinamentos, bem como toda orientação na forma de conduzir e realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Eugênio Cavasini

Pela coorientação, pelo esclarecimento de dúvidas, pelo apoio e por sempre ter acreditado no meu trabalho.

À Profa. Dra. Cinara de Cássia Brandão de Mattos

Pela oportunidade, carinho, atenção, compreensão e disponibilidade em me auxiliar todas as vezes que foi necessário.

Aos demais colaboradores do projeto

Em especial, ao Prof. Dr. Reynaldo Bestetti por toda a colaboração na triagem dos pacientes, bem como na forma de classificação dos mesmos. Por sempre estar disposto a auxiliar e esclarecer minhas dúvidas. Pelas considerações sempre relevantes sobre a pesquisa. Pelo reconhecimento do meu esforço na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy e à Profa. Dra. Lilian Castiglioni pela atenção e auxílio quando necessário.

Ao Professor Stephen Henry (Auckland University of Technology - Nova Zelândia) pela atenção, apoio, incentivo e contribuição no projeto de doença de Chagas.

À Profa. Dra. Sônia Maria Oliani pela atenção e por ter permitido realizar a dosagem das citocinas no seu laboratório. E também, à sua aluna Kallyne Mimura por todo o auxílio durante a realização do experimento.

Ao Prof. Dr. Otávio Ricci Junior pelo auxílio na composição do grupo controle.

Ao Laboratório de Imunogenética

À Cássia por me auxiliar no desenvolvimento do projeto, pela amizade, pelas palavras sábias e edificantes, por deixar o ambiente leve, pelo incentivo, por me falar (insistentemente) do poder da Fé, por acreditar em mim. À Ana Vitória pelo auxílio na execução do projeto, pela amizade, pelos conselhos, pelas nossas conversas, pelo apoio

e incentivo. À Fabiana pelo apoio, amizade, pelas risadas, por esclarecer minhas dúvidas, por estar sempre disposta a ajudar. Ao Márcio por todos os auxílios, pela amizade, pela força nos momentos difíceis e por descontrair o ambiente. À Cidinha por me ajudar quando necessário, pelo apoio e amizade. À Christiane pelo apoio, amizade, incentivo, por todas as dicas, por esclarecer as minhas dúvidas e pelo auxílio quando foi preciso. A todos os alunos do laboratório, à Valquíria, Natália, Mirele, Marina, Júlia, Mariana, Regina, Karina, ao Fernando, Marcos, Ulysses, Geraldo, Vinícius, Alessandro, pelas conversas, risadas e por todo o auxílio. Também quero agradecer a todos os alunos e profissionais que passaram pelo laboratório durante o desenvolvimento do projeto. Ao Milton por ter colaborado no início do projeto. À Ana Iara pela acolhida, amizade e por todos os ensinamentos. Ao Igor pela convivência no início do projeto, pela amizade e por sempre acreditar em mim. À Camila por me auxiliar quando precisei.

Aos colegas de laboratório

À Joice, Patrícia, Ana Livia, Anelise, ao Gustavo Capatti, pela atenção, pela amizade e por esclarecerem as minhas dúvidas sempre que necessário. E à Márcia por ter me ajudado quando precisei. Ao Seu Bizutti e ao Julinho pela atenção e colaboração.

À FAPESP

Pelo suporte financeiro ao projeto.

À CAPES

Pela bolsa concedida.

Ao Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular, e ao Departamento de Cirurgia da FAMERP

Ao Dr. Reynaldo Bestetti, Dr. Aldenis Albanese Borin, Dr. Luiz Sérgio Ronchi, Dr. João Gomes Netinho, Dr. Eumildo C. Júnior, Dr. Daniel Fernando Villafanha, Dr. Francisco e funcionários. Obrigada pela parceria, colaboração e auxílio na obtenção das amostras.

Aos pacientes do ambulatório e aos doadores de sangue

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

Às funcionárias da limpeza

Por realizarem seu trabalho com muito carinho.

Aos membros da banca examinadora

Pelo carinho, atenção e disponibilidade em contribuir na finalização deste trabalho.

Aos meus amigos

A todos os meus amigos que fizeram dessa caminhada mais suave. Obrigada pelo carinho e compreensão.

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

Epígrafe

“Fazer bem um trabalho, de uma perspectiva filosófica, não significa necessariamente fazê-lo com perfeição, ou melhor do que qualquer outra pessoa. Não há nenhum significado moral em vencer ou perder uma corrida. O vencedor pode ser o corredor mais rápido, mas isso não tem nada a ver com o fato de ele ser uma boa pessoa. O valor está em trabalhar com afinco e fazer o melhor possível (...).” Lou Marinoff

“Tudo é possível àquele que crê”. (Marcos 9:23)

Lista de figuras:

Introdução.

Figura 1. Ciclo de vida do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 2. Achados comuns na doença de Chagas crônica.....	6
Figura 3. Diagnóstico da doença de Chagas crônica.....	7

Artigo 4.

Figura 1. Concentrações plasmáticas de CCL3 (A) e CCL4 (B) obtidas de pacientes com a forma digestiva e cardíaca (CCC) da doença de Chagas crônica.....	92
Figura 2. Concentrações plasmáticas de CCL3 (A) e de CCL4 (B) obtidas de pacientes com a forma cardíaca (CCC), com função sistólica ventricular esquerda normal e com DSVE (disfunção sistólica ventricular esquerda).....	93
Figura 3. Concentrações plasmáticas de CCL3 (A) e de CCL4 (B) obtidas de pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas e cardíaca (CCC) com DSVE (disfunção sistólica ventricular esquerda).....	94

Lista de tabelas

Artigo 1.

Table 1. Genotype and allele frequencies of the *CCR5*Δ32 polymorphism in Chagas' disease patients with normal left ventricular systolic function, and mild to moderate, and severe left ventricular systolic dysfunction..... 20

Table 2. Genotype and allele frequencies of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism in Chagas' disease patients with normal left ventricular systolic function, and mild to moderate, and severe left ventricular systolic dysfunction..... 20

Artigo 2.

Table 1. Frequency of genotypes and alleles of the *CCR5*Δ32 polymorphism in patients with chronic Chagas disease and control subjects..... 42

Table 2. Frequency of genotypes and alleles of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism in patients with chronic Chagas disease and control subjects..... 43

Table 3. *CCR5* 59029 A/G polymorphism analysis using the recessive inheritance model..... 44

Table 4. *CCR5* 59029 A/G polymorphism analysis using the model of dominant inheritance..... 45

Table 5. Frequency of genotypes and alleles of the *CCR5*Δ32 polymorphism in patients with chronic Chagas heart disease with normal left ventricular systolic function, mild to moderate, and severe left ventricular systolic dysfunction..... 46

Table 6. Frequency of genotypes and alleles of the *CCR5* 59029 A/G

polymorphism in patients with chronic Chagas heart disease with normal left ventricular systolic function, mild to moderate, and severe left ventricular systolic dysfunction..... 47

Artigo 3.

Tabela 1. Associação dos polimorfismos do gene *CCR5* com doença de Chagas.... 71

Artigo 4.

Tabela 1. Frequências dos gêneros feminino e masculino entre os grupos de pacientes com CCC com função sistólica ventricular esquerda normal e com disfunção sistólica ventricular esquerda..... 91

Lista de abreviaturas e símbolos

A	Adenina
CAPES	Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCC	Cardiopatía Chagásica Crônica
CCHD	Chronic Chagas Heart Disease
CCL2/MCP-1	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2/ Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
CCL3/MIP-1 α	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3/Macrophage Inflammatory Protein-1-alpha</i>
CCL4/MIP-1 β	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 4/ Macrophage Inflammatory Protein-1-beta</i>
CCL5/RANTES	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5/Regulated Upon Activation Normal T-cell Expressed, and Presumably Secreted</i>
CCL8/MCP-2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 8/Monocyte Chemoattractant Protein-2</i>
CCR5	<i>Chemokine (C-C motif) Receptor 5</i>
CEP	Comitê de ética em Pesquisa (<i>Research Ethics Committee</i>)
CXCL1/ MGSA	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1/ Melanoma Growth Stimulating Activity, Alpha</i>
CXCL10/ IP-10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10/ Interferon-Gamma-Inducible Protein 10</i>
CXCL9/ MIG	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 9/ Monokine Induced By</i>

Gamma Interferon

DNA	Ácido Dexoxirribonucléico (<i>Desoxirribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
DSVE	Disfunção Sistólica Ventricular Esquerda
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
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>)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
G	Guanina
GL (DF)	Graus de liberdade (<i>degrees of freedom</i>)
HAI	Hemaglutinação Indireta
HB	Hospital de Base
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFI	Imunofluorescência Indireta (<i>Indirect Immunofluorescence</i>)
IFN- γ	Interferon-gama (<i>Interferon-gamma</i>)
IgG	Imunoglobulina de classe G
IgM	Imunoglobulina de classe M
IL-10	Interleucina 10 (<i>Interleukin-10</i>)
IL-12	Interleucina 12 (<i>Interleukin-12</i>)

IL-1 β	Interleucina 1-beta (<i>Interleukin 1-beta</i>)
IL-2	Interleucina 2 (<i>Interleukin-2</i>)
IL-4	Interleucina 4 (<i>Interleukin-4</i>)
IL-6	Interleucina 6 (<i>Interleukin-6</i>)
Met-RANTES	N-terminal-methionylated RANTES
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
mL	Mililitro
ng/ μ L	Nanograma/microlitro
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	<i>Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism</i>
pg/mL	Picograma/mililitro
pM	Picomolar
RNA _m	RNA mensageiro
RX	Raios X
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa (<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>)
Δ	Delta
μ l	Microlitro
χ^2	Qui-quadrado

Resumo

Introdução: A doença de Chagas é resultante da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. As manifestações clínicas desta doença são representadas pelas seguintes formas: indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista. A resposta imune desempenha papel relevante na determinação do curso da infecção. O receptor para quimiocinas CCR5 e as quimiocinas CCL3 e CCL4 (ligantes deste receptor) estão envolvidos na migração de leucócitos para os locais de inflamação. **Objetivos:** Avaliar se os polimorfismos do gene *CCR5*, *CCR5*Δ32 (rs333), *CCR5* 59029 A/G (rs1799987) e as concentrações plasmáticas das quimiocinas CCL3 e CCL4 estão associados às diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica, bem como com a disfunção sistólica ventricular esquerda. **Casuística e métodos:** Foram incluídos no estudo 277 pacientes, sendo 109 com a forma digestiva da doença e 168 com a forma cardíaca. O grupo controle foi composto por 172 doadores de sangue com sorologia não reagente para o *T. cruzi*. O teste de ELISA foi realizado para confirmar a infecção por *T. cruzi*. Os polimorfismos foram identificados por PCR e PCR-RFLP. Os níveis plasmáticos das quimiocinas foram medidos usando ensaio multiplex Milliplex[®] MAP (Millipore). As variáveis contínuas foram comparadas utilizando o teste t não pareado. Para comparação dos demais resultados foram realizados o Teste Qui-quadrado e o Teste T de Student ou Teste de Mann-Whitney. **Resultados:** Os genótipos e alelos dos polimorfismos *CCR5*Δ32 e *CCR5* 59029 A/G não diferiram entre os pacientes com doença de Chagas crônica cardíaca, com e sem disfunção sistólica ventricular esquerda. Foi observada maior frequência do genótipo *AA* nos pacientes com a forma cardíaca da doença, bem como frequência elevada do genótipo *AG* nos pacientes com a forma digestiva. Não houve diferenças nas concentrações de CCL3 e CCL4 entre os pacientes

com doença digestiva e cardíaca, como também entre os pacientes com função sistólica ventricular esquerda normal e com disfunção. Maiores níveis plasmáticos de CCL3 e CCL4 foram verificados nos pacientes com disfunção sistólica ventricular esquerda, comparados com aqueles com a forma digestiva. **Conclusões:** Os polimorfismos *CCR5*Δ32 (rs333) e *CCR5* 59029 A/G (rs1799987) não estão associados à disfunção sistólica ventricular esquerda nos pacientes com doença de Chagas crônica cardíaca. O polimorfismo *CCR5*Δ32 parece não influenciar nas diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas. Nossos resultados mostram o envolvimento do polimorfismo *CCR5* 59029 A/G na suscetibilidade diferencial às formas clínicas da doença de Chagas crônica, na população estudada. As concentrações plasmáticas de CCL3 e CCL4 parecem não estar envolvidas na suscetibilidade diferencial às formas clínicas da doença de Chagas crônica, como também no desenvolvimento da disfunção sistólica ventricular esquerda. Nestes pacientes, maior atividade inflamatória dependente de CCL3 e CCL4 pode ocorrer, em relação à forma digestiva da doença.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, *CCR5*, Quimiocina CCL3, Quimiocina CCL4.

Abstract

Introduction: Chagas disease is a disease resulting from infection by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The clinical manifestations of this disease are represented by the following forms: indeterminate, cardiac, digestive or mixed. The immune response plays an important role in determining the outcome of infection. The CC chemokine receptor 5 (CCR5) and chemokines CCL3 and CCL4 (ligands of this receptor) are involved in the migration of leukocytes to sites of inflammation. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate if the *CCR5*Δ32 (rs333) and *CCR5* 59029 A/G (rs1799987) polymorphisms of the *CCR5* gene and plasma concentrations of chemokines CCL3 and CCL4 are associated with different clinical forms of chronic Chagas disease and with left ventricular systolic dysfunction. **Methods:** The study included 277 patients, 109 with the digestive form of the disease and 168 with the cardiac form. The control group comprised 172 blood donors with negative serology for *T. cruzi*. Infection by *T. cruzi* was confirmed by ELISA. The polymorphisms were identified by PCR and PCR-RFLP. The chemokines levels were measured using a Milliplex® MAP multiplex assay (Millipore). The unpaired t test was used to compare continuous variables. Chi-square, the Student's t test or Mann-Whitney test were used to compare the results. **Results:** The genotypes and alleles of the *CCR5*Δ32 and *CCR5* 59029 A/G polymorphisms did not differ between the patients with Chronic Chagas heart disease with and without left ventricular systolic dysfunction. There was a higher frequency of the *AA* genotype in patients with Chronic Chagas heart disease, as well as high frequency of *AG* genotype in patients with the digestive form. There were no differences in the concentrations of CCL3 and CCL4 among patients with digestive and heart disease, as well as in patients with normal left ventricular systolic function and dysfunction. The plasma

concentrations of both CCL3 and CCL4 were greater in patients with left ventricular systolic dysfunction than in those with the digestive form. **Conclusions:** The *CCR5*Δ32 (rs333) and *CCR5* 59029 A/G (rs1799987) polymorphisms had no relationship with left ventricular systolic dysfunction in patients with chronic Chagas' heart disease. The *CCR5*Δ32 polymorphism does not seem to influence the different clinical manifestations of Chagas disease. The results of this study show the involvement of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism in susceptibility to the different clinical forms of chronic Chagas disease in this study population. Plasma concentrations of CCL3 and CCL4 may not be involved in the differential susceptibility to clinical forms of chronic Chagas disease, as well as in the development of left ventricular systolic dysfunction. In these patients, increased inflammatory activity dependent CCL3 and CCL4 can occur in relation to the digestive form of the disease.

Keywords: Chagas Disease, *Trypanosoma cruzi*, CCR5, Chemokine CCL3, Chemokine CCL4.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, resultante da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi descrita pelo médico e cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas.⁽¹⁾ A doença é endêmica em áreas de 21 países da América Latina e atualmente de 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi*, segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde.⁽²⁾ Ocorrem aproximadamente 28.000 novos casos a cada ano, com 8.000 casos de infecção durante a gestação, e outros 65 milhões de pessoas vivem sob o risco de adquirir a doença.⁽³⁾ A doença de Chagas é uma doença negligenciada, que afetava áreas rurais e pobres da América Central e Sul.⁽⁴⁾ Posteriormente, a doença também se tornou um problema urbano, devido a crescente urbanização ocorrida desde 1940.⁽⁵⁾ Atualmente, com a migração internacional, a infecção não está confinada a América Latina, atingindo áreas não endêmicas, como regiões dos Estados Unidos, Europa, Ásia e Oceania.^(6,7)

As mais tardias evidências de infecção humana pelo *T. cruzi*, que datam cerca de 9.000 anos, ocorreram em múmias do norte do Chile e Sul do Peru, nas quais foram identificados DNA do parasito.⁽⁸⁾ Em 1835 Charles Darwin relata em seu diário ter sido picado por um inseto triatomíneo quando visitava o Chile e os sintomas apresentados posteriormente sugerem ser devidos à doença de Chagas.⁽¹⁾ No entanto, apenas em 1909 o *T. cruzi* foi identificado como agente etiológico da doença de Chagas, quando Carlos Chagas identificou a presença do parasito no sangue de uma criança febril, chamada Berenice, sendo este o primeiro caso clínico descrito da doença. Posteriormente, Carlos Chagas descreveu a morfologia do *T. cruzi*, os reservatórios, o ciclo de vida tanto nos

hospedeiros vertebrados, quanto nos invertebrados, a epidemiologia, as manifestações clínicas e diversos aspectos da doença.⁽⁹⁻¹¹⁾

A infecção pelo *T. cruzi* pode ser adquirida pelo homem de diversas maneiras, como por meio de insetos vetores, considerado o mecanismo de transmissão de maior importância epidemiológica. A transfusão sanguínea é outro meio de transmissão de grande importância epidemiológica, que com a migração internacional, emergiu nas áreas não endêmicas.^(7,9) Também pode ocorrer transmissão congênita e oral, sendo esta última adquirida pela ingestão de alimentos e bebidas contaminados com o *T. cruzi*.^(7,11) Além desses mecanismos de transmissão principais citados, há os meios de transmissão secundários, que ocorrem com menor frequência, tais como acidentes de laboratório e transplantes de órgãos.⁽⁷⁾

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*.⁽¹²⁾ São observadas várias formas evolutivas de *T. cruzi* em seu ciclo biológico, e em todas elas verifica-se a presença de uma mitocôndria modificada com abundante DNA, denominada cinetoplasto.⁽⁹⁾ São reconhecidas mais de 100 espécies de reservatórios para o *T. cruzi* e mais de 140 espécies de vetores.⁽⁷⁾ Os insetos vetores desse parasito são triatomíneos da família Reduviidae, sendo os epidemiologicamente mais significantes representados por: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus*.⁽¹³⁾

O ciclo de vida desse parasito é complexo, ocorrendo no hospedeiro vertebrado uma fase de multiplicação intracelular, e no inseto vetor, extracelular. Durante o hematofagismo, os tripomastigotas metacíclicos (forma infectante para os vertebrados)

são eliminados nas fezes e urina do inseto vetor e por meio das mucosas ou ferimentos na pele, ocorre interação entre a célula hospedeira e o parasito.⁽⁹⁾ O *T. cruzi* tem a capacidade de infectar diferentes tipos celulares, como por exemplo, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e células do miocárdio.⁽¹⁴⁾ A descrição completa do ciclo do *T. cruzi* encontra-se na figura 1.

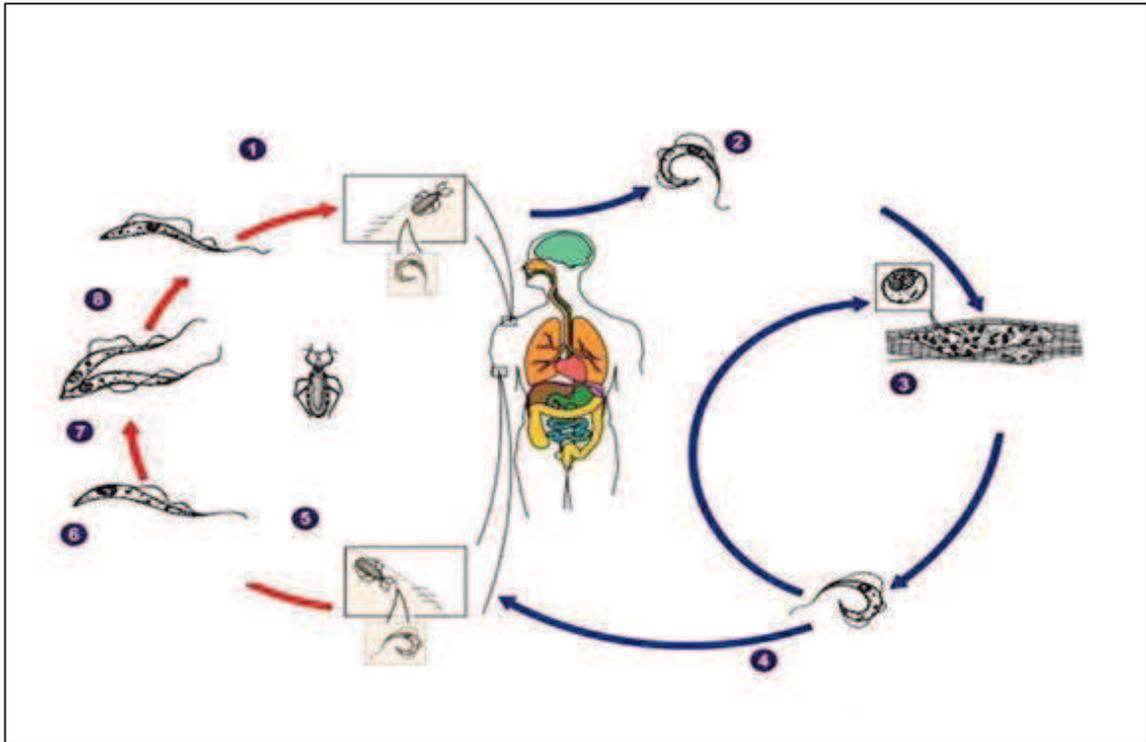


Figura 1. Ciclo de vida do protozoário *Trypanosoma cruzi* – (1) Durante o hematofagismo, o inseto infectado elimina os tripomastigotas metacíclicos nas fezes e urina. (2) Os tripomastigotas invadem células, como os macrófagos, onde se transformam em amastigotas. (3) Dentro das células, os amastigotas 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.⁽¹⁵⁾

Na doença de Chagas ocorre a fase aguda e posteriormente a fase crônica. Geralmente a fase aguda é assintomática e manifestações locais na região de entrada do parasito como sinal de Romaña e chagoma de inoculação podem ser observadas, se o meio de transmissão for vetorial. Os sintomas da fase aguda incluem febre, mal estar, poliadenia, hepatoesplenomegalia, insuficiência cardíaca e às vezes meningoencefalite, esta que pode ocorrer em crianças e pacientes imunossuprimidos.^(9,16) Após a fase aguda, cerca de 60% dos indivíduos infectados apresentam a forma clínica indeterminada da infecção, caracterizada por ausência de sintomas, estudos radiológicos e eletrocardiográficos aparentemente normais e sorologia reagente para o *T. cruzi*.⁽¹²⁾ Cerca de 20 anos após a infecção, os indivíduos infectados cronicamente podem vir a desenvolver as seguintes formas crônicas da doença: cardíaca, digestiva ou mista. Aproximadamente 30% deles desenvolvem a Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC), correspondente à forma cardíaca da doença, enquanto cerca de 10% desenvolvem a forma digestiva e ainda, manifestações cardíacas e digestivas são observadas em alguns pacientes, caracterizando a forma mista da doença.^(1,6)

A principal manifestação clínica da doença de Chagas é a CCC, pela frequência em que ocorre e pela gravidade, responsável por óbito de pacientes nas áreas endêmicas e mais recentemente, causa de doenças cardíacas nos EUA e Europa.^(1,16) Insuficiência cardíaca sistólica crônica,⁽¹⁷⁾ arritmias ventriculares,⁽¹⁸⁾ eventos tromboembólicos,⁽¹⁶⁾ morte súbita cardíaca,⁽¹⁸⁾ e dor no peito precordial⁽⁶⁾ são as manifestações desta forma da doença.

A forma digestiva da doença é representada por megaesôfago e megacólon, decorrentes da dilatação do esôfago e cólon respectivamente.⁽¹⁾ As manifestações clínicas devido ao megaesôfago incluem ptialismo, disfagia, regurgitação, dor

epigástrica e, em alguns casos, desnutrição. O megacólon pode causar distensão abdominal, obstipação e obstrução do intestino. Maior prevalência de desenvolver câncer de esôfago é observada nos pacientes com megaesôfago.⁽⁴⁾ As manifestações clínicas comumente encontradas na fase crônica da doença de Chagas estão resumidas na figura 2.

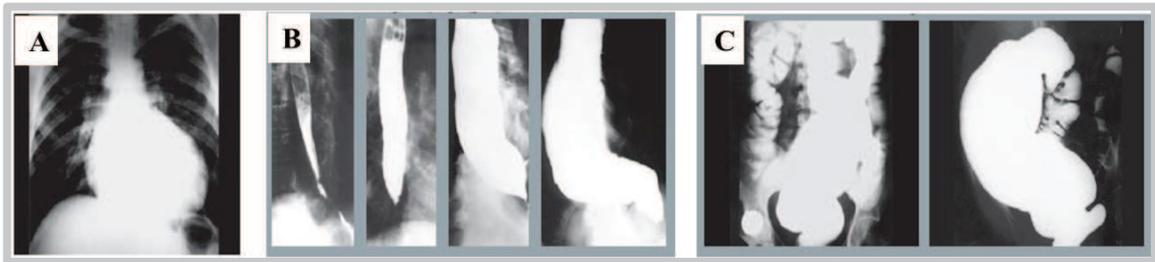


Figura 2. Achados comuns na doença de Chagas crônica. (Adaptado).⁽⁴⁾

(A) Cardiopatia Chagásica Crônica (cardiomegalia). (B). Megaesôfago (graus I, II, III e IV, respectivamente). (C). Megacólon.

Durante a fase aguda da infecção, o diagnóstico laboratorial é realizado pela pesquisa direta de parasitos no sangue periférico por meio dos seguintes testes: exame de sangue a fresco, gota espessa e esfregaço sanguíneo.⁽⁹⁾ Devido à baixa parasitemia que ocorre na fase crônica, o diagnóstico laboratorial deve ser realizado por meio dos testes sorológicos. Os anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG podem ser detectados por imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme linked immunosorbent assay*) e hemaglutinação indireta (HAI), sendo recomendado a realização de dois testes sorológicos diferentes para precisão do diagnóstico.^(4,9) Geralmente, quando os testes sorológicos são inconclusivos, o diagnóstico molecular por Reação em cadeia da polimerase (PCR) é recomendado.⁽¹⁹⁾ Na fase crônica é possível realizar o diagnóstico clínico por meio de avaliação clínica, eletrocardiograma e raios X (esôfago e cólon).⁽²⁰⁾ (Figura 3).

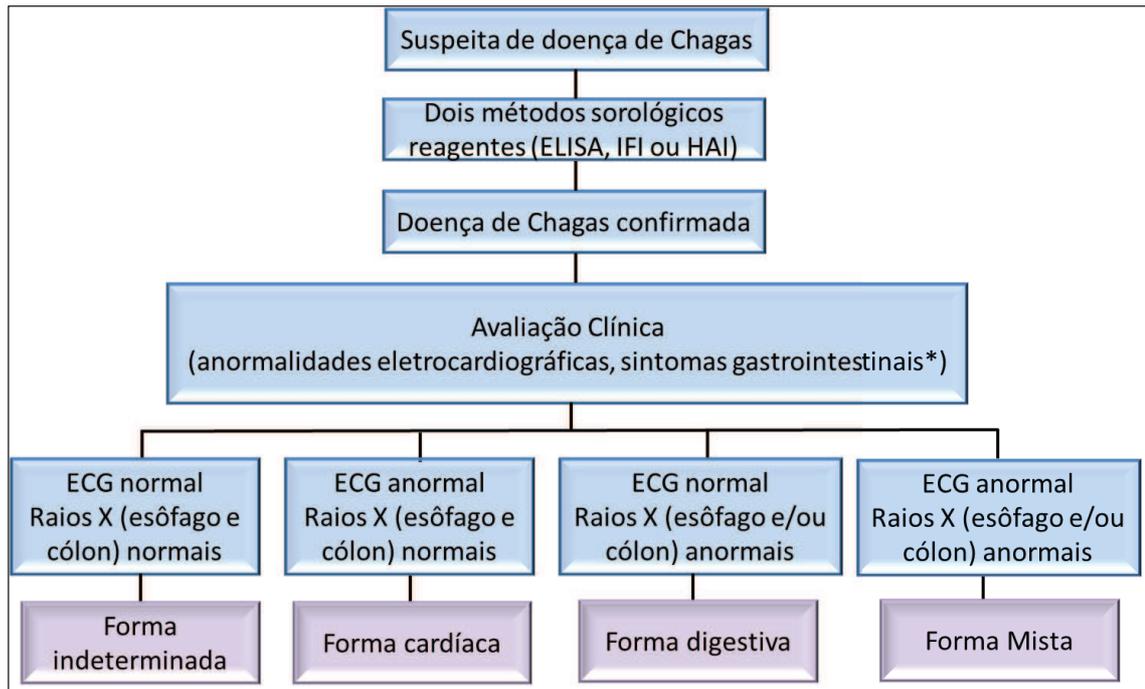


Figura 3. Diagnóstico da doença de Chagas crônica. (Adaptado).⁽⁴⁾

ELISA =Enzyme linked immunosorbent assay. IFI =imunofluorescência indireta. HAI =Hemaglutinação indireta. ECG =eletrocardiograma. *disfagia é o sintoma predominante (megaesôfago); constipação é o sintoma predominante (megacólon).

A terapêutica da doença de Chagas ainda é limitada. Existem apenas duas drogas para o tratamento dessa enfermidade: nifurtimox e benzonidazol, as quais apresentam melhor eficácia no início da fase aguda da infecção. Estas drogas podem provocar efeitos colaterais graves e resistência. No Brasil, apenas o benzonidazol está sendo comercializado.^(9,11) Terapias alternativas para o tratamento da doença vêm sendo testadas, como por exemplo, o uso de antifúngicos azólicos.⁽²¹⁾

1.2 Resposta imune contra o *T. cruzi*

O controle do *T. cruzi* envolve a imunidade inata e adquirida por meio da mobilização de uma variedade de células tais como, células *Natural Killer* (NK), células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B.^(14,22)

A interação das células do sistema imune inato com os componentes do *T. cruzi* (glicoconjugados de membrana) pode ocorrer por meio dos receptores Toll-Like, presentes nos macrófagos e células dendríticas.^(23,24) A infecção dos macrófagos pelo *T. cruzi* resulta na secreção de Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e de Interleucina 12 (IL-12), que induz a secreção de Interferon-gama (IFN- γ) pelas células NK. IFN- γ ativa os macrófagos que destroem os parasitos pela produção de Óxido Nítrico (NO).⁽¹⁾ Interleucina 10 (IL-10) e Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- β) são citocinas regulatórias que modulam os efeitos da ativação dos macrófagos, como a produção de NO e a atividade tripanocida.⁽²⁵⁾

Depois de invadir a célula hospedeira, o *T. cruzi* pode escapar do vacúolo parasitóforo e ir para o citosol, no qual se diferencia em amastigota e o processo de replicação é iniciado. Os antígenos do parasito são processados e apresentados por moléculas do Complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe I, que são reconhecidos pelas células T CD8⁺. O controle do *T. cruzi* pelas células T CD8⁺ está relacionado principalmente à produção de IFN- γ e à atividade citotóxica contra a célula infectada, destacando-se o papel desempenhado pela perforina.⁽²⁶⁾

A contribuição das células T CD4⁺ com fenótipo T_H1 na defesa do hospedeiro incluem: a produção de IFN- γ , a qual ativa os macrófagos infectados a eliminarem o parasito; a diferenciação e ativação das células T CD8⁺ e a participação indireta na síntese de anticorpos que ativam o sistema complemento, por meio da síntese de IFN- γ . A presença destas células no tecido cardíaco é breve, sendo posteriormente substituídas por células T CD8⁺.⁽²⁵⁾

Em síntese, na imunidade humoral, durante a fase aguda da infecção, a maioria dos pacientes apresentam anticorpos de isotipos IgM e IgG.⁽²⁵⁾ No fim da fase aguda e

na fase crônica, os parasitos extracelulares liberados de ninhos teciduais são eliminados pelos anticorpos IgG específicos contra o *T. cruzi*.⁽²²⁾

A resposta imune contra o *T. cruzi* não é capaz de eliminar o parasito, apenas controla seu crescimento, resultando na sua persistência no hospedeiro. A resposta imune prolongada pode culminar com as lesões teciduais encontradas nas formas clínicas da doença.⁽⁹⁾

1.3 Mecanismos envolvidos na patogênese da doença

Os mecanismos patogênicos envolvidos na doença de Chagas podem ser explicados por duas hipóteses principais, a persistência do parasito e autoimunidade, embora a patogênese da doença não esteja totalmente estabelecida. A primeira hipótese aponta a persistência do parasito como responsável por manter a inflamação, e a segunda, sugere que o dano tecidual observado nos órgãos afetados é decorrente de resposta imune contra antígenos próprios.^(27,28)

A presença de intenso infiltrado inflamatório, com predomínio das células mononucleares, principalmente as células T CD8⁺, é verificada no miocárdio dos pacientes com CCC.⁽²⁷⁾ As células inflamatórias no miocárdio desempenham papel de efetoras nos danos cardíacos.⁽²³⁾ Da mesma forma, na doença de Chagas digestiva, há associação das lesões encontradas nas células musculares com o infiltrado inflamatório e fibrose.⁽²⁷⁾ Na forma indeterminada da infecção, no que diz respeito à resposta imune, parece haver uma situação de equilíbrio entre o parasito e o hospedeiro. Alguns elementos sugerem uma imunidade parcialmente protetora, como a presença de IL-10, associada com controle da doença.⁽²⁷⁾

A expressão das quimiocinas CXCL1 (MGSa), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES) ocorre no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção, e CXCL9, CXCL10 e CCL5 também são produzidas na fase crônica, mesmo na escassez do parasito.⁽²⁹⁾ Os pacientes com CCC apresentam resposta imune T_H1 exacerbada. A expressão de IFN- γ , TNF- α e Interleucina 6 (IL-6) foi verificada nas células mononucleares infiltradas no tecido cardíaco destes pacientes, assim como, expressão reduzida de Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 4 (IL-4) e IL-10.⁽²³⁾

As células T_H1 desempenham papel relevante na produção da citocina IFN- γ , a qual é de grande importância no controle da infecção, mas também contribui para a inflamação do miocárdio.⁽²⁶⁾ Esta citocina induz a expressão de CCL5, CXCL10, CXCL9 e moléculas de adesão, contribuindo na migração das células T e inflamação do miocárdio.⁽²⁶⁾ As lesões cardíacas observadas na CCC podem ser decorrentes da produção local de citocinas inflamatórias e de quimiocinas pelas células T do infiltrado inflamatório cardíaco.⁽³⁰⁾

Recentemente, maior expressão de IL-10 foi verificada em pacientes com a forma indeterminada da infecção. No mesmo estudo, os pacientes com cardiomiopatia apresentaram expressão elevada de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e Interleucina 1-beta (IL-1 β). Além disso, a melhor função cardíaca foi associada com maior expressão de IL-10.⁽³¹⁾ Dados experimentais revelaram a expressão de TNF- α por monócitos de pacientes cardíacos, enquanto que monócitos de pacientes com a forma indeterminada da infecção expressaram IL-10.⁽²⁷⁾

Maior frequência de células T regulatórias foi verificada nos pacientes com a forma indeterminada da infecção. Alguns dados sugerem a contribuição destas células

no controle da resposta imune, como também a importância do equilíbrio entre células T efetoras e regulatórias na progressão e desenvolvimento da doença.⁽³²⁾

Os autores de um estudo verificaram maior produção basal IFN- γ na forma digestiva da doença de Chagas, e maior produção de IL-4 nos pacientes com megaesôfago, comparados com aqueles que apresentam megacólon.⁽³³⁾ Outros autores verificaram nos indivíduos com a forma digestiva da doença, maior produção de IL-10, em relação aos grupos indeterminado, cardíaco e controle.⁽³⁴⁾ Em outro estudo, nos pacientes com megaesôfago a produção de IFN- γ e CXCL9 foi mais elevada, quando comparados com o grupo controle.⁽³⁵⁾

1.4 Quimiocinas, receptor para quimiocinas CCR5, polimorfismos *CCR5* Δ 32 (rs333) e *CCR5* 59029 A/G (rs1799987)

As quimiocinas (citocinas quimiotáticas) são pequenas proteínas envolvidas na migração de leucócitos.^(36,37) De acordo com o número e espaçamento dos resíduos de cisteínas próximas ao domínio amino terminal, as quimiocinas foram divididas em quatro famílias: CC, CXC, C e CX₃C.^(36,38,39) A ação das quimiocinas ocorre por meio de receptores específicos pertencentes à superfamília de receptores com sete domínios transmembrânicos acoplados a proteínas G.^(36,37,40)

O gene *CCR5*, localizado no cromossomo 3p21, apresenta 4 éxons e 2 íntrons, sendo que entre os éxons 2 e 3 não há intron.^(41,42) Este gene apresenta 2 regiões promotoras e padrões de *splicing* alternativo podem originar 2 transcritos denominados *CCR5A* e *CCR5B*, que codificam a mesma proteína.⁽⁴²⁾

O receptor para quimiocinas *CCR5* é uma proteína composta de 352 aminoácidos e seu peso molecular é de 40,6 kDa.⁽⁴³⁾ *CCR5* é correceptor para o vírus da

imunodeficiência humana-1 (HIV-1).^(44,45) Os ligantes deste receptor são as quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5 e CCL8 (MCP-2) que atraem monócitos, macrófagos, células T ativadas e de memória, que expressam CCR5.^(36,39,43)

A deleção de 32 pares de base na região codificante do gene *CCR5* (*CCR5Δ32*) resulta na geração de uma proteína truncada, ausente na superfície celular. Níveis reduzidos de expressão deste receptor ocorrem nos indivíduos heterozigotos (*CCR5/CCR5Δ32*).^(41,46) O polimorfismo localizado na região promotora do gene *CCR5* (*CCR5* 59029 A/G) afeta o nível de expressão do receptor na superfície celular. Como a maior atividade promotora *in vitro* é resultante do alelo *A*, o genótipo *AA* resulta na maior expressão de CCR5 na superfície celular.^(47,48)

1.5 CCR5 e seus ligantes na doença de Chagas

O papel de CCR5, na infecção por *T. cruzi*, foi investigado por alguns pesquisadores.⁽⁴⁹⁻⁵⁴⁾ A contribuição de CCR5 no controle da replicação do *T. cruzi* foi revelada por alguns estudos.^(53,55) Por outro lado, CCR5 também foi associado com a patogênese da CCC.^(54,56,57)

O polimorfismo *CCR5* 59029 A/G foi associado com proteção no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica.^(58,59) Associação do genótipo *CCR5/CCR5Δ32* com proteção no desenvolvimento da cardiomiopatia foi sugerida.⁽⁵⁹⁾ Outras variantes genéticas de *CCR5* foram associadas com suscetibilidade a CCC e outras com papel protetor no desenvolvimento desta cardiopatia.⁽⁵⁰⁻⁵²⁾

As quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5 (ligantes de CCR5) foram avaliadas na infecção por *T. cruzi* por estudos independentes.^(55,57,60) Foi relatado o envolvimento de CCL3, CCL4 e CCL5 na produção de NO pelos macrófagos humanos, na infecção por

T. cruzi.⁽⁶¹⁾ A presença de CCL3, CCL4 e CCL5 foi verificada no miocárdio de camundongos infectados com *T. cruzi*.⁽⁵⁵⁾ Evidências experimentais sugerem que na infecção aguda por *T. cruzi* há o envolvimento de CCL3 no recrutamento celular.⁽⁶²⁾ Por outro lado, no controle da infecção por *T. cruzi* em ratos, as quimiocinas CCL3 e CCL5 foram consideradas relevantes.⁽⁶⁰⁾

Assim, está claro o envolvimento de CCR5 e seus ligantes na infecção pelo *T. cruzi*, no entanto é importante realizar uma avaliação nas formas evolutivas da doença de Chagas crônica, pois os fatores de suscetibilidade que levam os indivíduos a desenvolverem as distintas formas clínicas desta enfermidade ainda não são totalmente compreendidos.

1.6 Objetivos

O presente estudo teve como objetivo geral verificar a hipótese de que polimorfismos do gene *CCR5* e ligantes de *CCR5* (quimiocinas CCL3 e CCL4) estão associados às diferentes formas clínicas da doença de Chagas, bem como, com a disfunção sistólica ventricular esquerda nos pacientes com doença de Chagas crônica cardíaca. Os objetivos específicos foram:

1. Investigar os polimorfismos *CCR5*Δ32 (rs333) e *CCR5* 59029 A/G (rs1799987) nos pacientes com doença de Chagas crônica cardíaca, com e sem disfunção sistólica ventricular esquerda.

2. Investigar os polimorfismos *CCR5*Δ32 e *CCR5* 59029 A/G nos pacientes com as formas clínicas digestiva e cardíaca da doença de Chagas crônica, e nos indivíduos sem a infecção pelo *T. cruzi*.

3. Avaliar se diferenças nos níveis plasmáticos das quimiocinas CCL3 e CCL4 estão envolvidas na susceptibilidade diferencial às formas digestiva e cardíaca da doença de Chagas crônica.

4. Verificar se as concentrações plasmáticas das quimiocinas CCL3 e CCL4 estão envolvidas no desenvolvimento da disfunção sistólica ventricular esquerda, nos pacientes com doença de Chagas crônica cardíaca.

2. ARTIGOS

2. Artigos

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de 4 artigos, sendo um artigo publicado, um submetido à publicação e dois manuscritos.

Artigo 1

Título: *CCR5 chemokine receptor gene variants in chronic Chagas' disease*

Autores: Amanda P. Oliveira, Cássia R. Bernardo, Ana V.S. Camargo, Daniel F. Villafanha, Carlos E. Cavasini, Cinara C. Brandão de Mattos, Moacir F. de Godoy, Reinaldo B. Bestetti, Luiz C. de Mattos.

Periódico: International Journal of Cardiology, 176:520-522; 2014.

Artigo 2

Título: Genetic susceptibility to cardiac and digestive clinical forms of chronic Chagas disease: involvement of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism

Autores: Amanda Priscila de Oliveira, Cássia Rubia Bernardo, Ana Vitória da Silveira Camargo, Luiz Sérgio Ronchi, Aldenis Albaneze Borim, João Gomes Netinho, Eumildo de Campos Júnior, Cinara de Cássia Brandão de Mattos, Carlos Eugênio Cavasini, Reinaldo Bulgarelli Bestetti, Luiz Carlos de Mattos.

Periódico: Plos One (submetido para publicação).

Artigo 3

Título: O papel de *CCR5* na doença de Chagas – uma revisão sistemática

Autores: Amanda P. de Oliveira, Christiane M. Ayo, Reinaldo B. Bestetti, Cinara C. B. de Mattos, Carlos E. Cavasini, Luiz C. de Mattos.

Periódico: Acta Tropica (a ser submetido para publicação).

Artigo 4

Título: Concentrações plasmáticas de CCL3 e CCL4 nas formas clínicas digestiva e cardíaca da doença de Chagas crônica

Autores: Amanda Priscila de Oliveira, Christiane Maria Ayo, Kallyne Kioko Oliveira Mimura, Sonia Maria Oliani, Cássia Rubia Bernardo, Ana Vitória da Silveira Camargo, Luiz Sérgio Ronchi, Aldenis Albaneze Borim, João Gomes Netinho, Cinara de Cássia Brandão de Mattos, Daniel Fernando Villafanha, Lilian Castiglioni, Reinaldo Bulgarelli Bestetti, Carlos Eugênio Cavasini, Luiz Carlos de Mattos.

Periódico: The Journal of Infectious Diseases (a ser submetido para publicação).

CCR5 chemokine receptor gene variants in chronic Chagas' disease



Amanda P. Oliveira^a, Cássia R. Bernardo^a, Ana V.S. Camargo^a, Daniel F. Villafanha^{b,d}, Carlos E. Cavasini^c, Cinara C. Brandão de Mattos^a, Moacir F. de Godoy^{b,d}, Reinaldo B. Bestetti^{b,d}, Luiz C. de Mattos^{a,*}

^a Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

^b Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

^c Centro de Investigação de Microrganismos, Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil

^d Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular, Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina, São José do Rio Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 May 2014

Accepted 5 July 2014

Available online 12 July 2014

Keywords:

CCR5

Chagas' disease

Left ventricular systolic dysfunction

Chronic Chagas heart disease affects approximately 30% of patients infected by the protozoan *Trypanosoma cruzi* around 20 years after infection. The clinical manifestations of this disease are malignant arrhythmias [1], chronic systolic heart failure [2], sudden cardiac death [3], and thromboembolism [4]. Tissue damage resulting from inflammatory infiltrates and persistence of *T. cruzi* in myocardial

tissue is involved in the pathogenesis of cardiomyopathy. However, the precise pathogenic mechanism of Chagas' heart disease is not completely elucidated [4,5].

The CC chemokine receptor 5 (CCR5) expressed by monocytes, macrophages and T_H1 cells is a receptor for the CCL3, CCL4 and CCL5 chemokines [6,7]. Genetic variants of the CCR5 gene may be involved in the differential susceptibility for Chagas cardiomyopathy [8–10].

In this study, we investigated the relationship of the CCR5Δ32 (rs333) and CCR5 59029 A/G (rs1799987) polymorphisms of the CCR5 gene in patients with chronic Chagas' disease, with and without left ventricular systolic dysfunction (LVSD); left ventricular ejection fraction (LVEF) is currently the most important predictor of all-cause mortality of patients with this condition [11].

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Medicine School in São José do Rio Preto (# 009/2011) and informed consent was obtained from all patients. A total of 168 consecutive male and female patients were enrolled from the Cardiomyopathy Outpatient Service of Hospital de Base of the Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Anti-*T. cruzi* antibodies were detected by immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (ELISAcruci; bioMerieux S.A. Brazil).

Patients were divided into three groups according to the LVEF; patients with LVEF >60%, between 60% and 40% and those with LVEF <40% as calculated using the Teichholz' method were classified as without, mild, and severe LVSD, respectively. The severe group was defined according to the Brazilian guidelines of severe chronic heart disease [12]. For patients in which the LVEF was measured by

* Corresponding author at: Laboratório de Imunogenética—Departamento de Biologia Molecular—Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 São José do Rio Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 17 3201 5857; fax: +55 17 3229 1777.

E-mail addresses: apriolli@yahoo.com.br (A.P. Oliveira), cassiarubia.b@gmail.com (C.R. Bernardo), avscamargo@yahoo.com.br (A.V.S. Camargo), daniel.villafanha@terra.com.br (D.F. Villafanha), cecavasinifamerp.br (C.E. Cavasini), mattosci@gmail.com (C.C. Brandão de Mattos), mf60204@gmail.com (M.F. de Godoy), rbestetti44@gmail.com (R.B. Bestetti), luiz.demattos@famerp.br, luiz.demattos@outlook.com (L.C. de Mattos).

Table 1
Genotype and allele frequencies of the CCR5Δ32 polymorphism in Chagas' disease patients with normal left ventricular systolic function, and mild to moderate, and severe left ventricular systolic dysfunction.

Genotypes	Normal		Mild/moderate LVSD		Severe LVSD	χ ²	DF	p ^a	
	No.	%	No.	%					
CCR5Δ32									
CCR5/CCR5	78	(91.8)	40	(93.0)	34	(85.0)	1.880	2	0.391
CCR5/CCR5Δ32	7	(8.2)	3	(7.0)	6	(15.0)			
Total	85	(100.0)	43	(100.0)	40	(100.0)			
Alleles									
CCR5	163	(95.9)	83	(96.5)	74	(92.5)	1.786	2	0.409
CCR5Δ32	7	(4.1)	3	(3.5)	6	(7.5)			

^a Calculated by χ²; LVSD: Left ventricular systolic dysfunction; DF: Degree of freedom.

radionuclide ventriculography, a LVEF >50% indicated normal left ventricular systolic function, LVEF between 30% and 50% indicated mild to moderate LVSD, and a LVEF <30% was consistent with severe LVSD.

Genomic DNA was attained using a commercial kit for silica column extraction (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen, Carlsbad, California/USA) and following the manufacturer's instructions. The CCR5Δ32 polymorphism of the CCR5 gene was identified by polymerase chain reaction (PCR), according to the protocol of Huang et al. [13]. The polymorphism of the promoter region of the CCR5 gene (CCR5-59029 A/G) was identified by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) as described by McDermott et al. [14]. Comparisons of proportions between groups were made by the chi-square test using the software GraphPad Instat (version 3.06). Differences were considered statistically significant for a p-value < 0.05.

The CCR5Δ32 polymorphism was investigated in 168 patients: 152 (90.5%) were wild type homozygotes, and 16 (9.5%) heterozygotes. Homozygotes for this deletion were not found. Table 1 shows data on allele and genotype frequencies. The CCR5 59029 A/G polymorphism was analyzed in 155 patients. The genotype frequencies were: AA (39.4%), AG (36.1%) and GG (24.5%). The data on allele and genotype frequencies are shown in Table 2.

The CCR5Δ32 deletion results in a non-functional receptor not detected on the cell surface, whereas heterozygous individuals for this polymorphism have reduced levels of CCR5 expression [15,16]. The results of this study show no association of genotypes and alleles of the CCR5Δ32 polymorphism between groups of patients with chronic Chagas' disease. A study suggested that the CCR5/CCR5Δ32 genotype can protect against inflammatory cardiomyopathy, a consequence of the chronic phase of Chagas' disease [9] but this study did not confirm this due to the low frequency of the CCR5/CCR5Δ32 genotype.

Table 2
Genotype and allele frequencies of the CCR5 59029 A/G polymorphism in Chagas' disease patients with normal left ventricular systolic function, and mild to moderate, and severe left ventricular systolic dysfunction.

Genotypes	Normal		Mild/moderate LVSD		Severe LVSD	χ ²	DF	p ^a	
	No.	%	No.	%					
CCR5 59029A/G									
AA	30	(37.5)	16	(40.0)	15	(42.9)	0.302	2	0.860
AG	29	(36.3)	14	(35.0)	13	(37.1)	0.038	2	0.981
GG	21	(26.2)	10	(25.0)	7	(20.0)	0.521	2	0.771
Total	80	(100.0)	40	(100.0)	35	(100.0)			
Alleles									
A	89	(55.6)	46	(57.5)	43	(61.4)	0.671	2	0.715
G	71	(44.4)	34	(42.5)	27	(38.6)			

^a Calculated by χ²; LVSD: Left ventricular systolic dysfunction; DF: Degree of freedom.

The CCR5 59029 A/G polymorphism of the promoter region alters the expression of CCR5 on the surface of leukocytes. It has been demonstrated that the A allele has higher promoter activity in vitro than the G allele and that the increased expression of CCR5 results from the AA genotype [14,17]. The genotypes and alleles of the CCR5 59029 A/G polymorphism did not differ between the groups of Chagas' disease patients included in this study.

Our results contrast with the results reported by other studies. Calzada et al. [8] found a higher frequency of the AG genotype and the presence of the G allele in asymptomatic patients compared to patients with cardiomyopathy. These authors suggested that the G allele could protect against the development of Chagas cardiomyopathy. Another study found a low frequency of the GG genotype in patients with arrhythmias compared to asymptomatic patients [9]. These authors suggested that this genotype may protect against the development of cardiomyopathy symptoms in individuals infected with *T. cruzi* [9].

The results of the work of Flórez et al. [10] did not show any significant association between the CCR5 59029 A/G polymorphism and protection against the development of Chagas' disease cardiomyopathy, however, the development of Chagas disease cardiomyopathy was associated with the HHA haplotype in which the G allele was present. The authors suggest that in this type of study it may be more appropriate to estimate haplotypes, as several polymorphisms in the promoter region may influence the CCR5 receptor expression levels and the cell type in which it is expressed [10,18].

In this study, the heart disease was evaluated according to the degree of LVSD. In other studies, the aim was not to investigate any possible relationship between CCR5Δ32 and CCR5 59029 A/G polymorphisms and left ventricular impairment, and so the criteria to classify patients were different [8–10]. These distinct strategies may have contributed to the discrepant results reported in this study compared to other research.

In conclusion, the CCR5Δ32 (rs333) and CCR5 59029 A/G (rs1799987) polymorphisms had no relationship with LVSD in patients with chronic Chagas' heart disease in this study population. Thus, these polymorphisms do not seem to influence left ventricular impairment.

The authors declare no conflicts of interest.

This work was supported by FAPESP (São Paulo Research Foundation) Grants #2011/08075-4, #2011/19439-7, #2012/20735-2, and #2012/05580-2 and Brazilian Ministry of Education–CAPES PhD Scholarship (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel, Brazil). Many thanks to Igor Isnardi Barreto for technical support (FAPESP #2012/03679-1) and to David Hewitt to proofread the English. Many thanks to Professor Stephen Henry, Auckland University of Technology, New Zealand, by the comments.

References

- Bestetti RB, Santos CR, Machado-Júnior OB, et al. Clinical profile of patients with Chagas' disease before and during sustained ventricular tachycardia. *Int J Cardiol* 1990;29:39–46.
- Bestetti RB, Otaviano AP, Cardinali-Neto A, da Rocha BF, Theodoropoulos TA, Corderio JA. Effects of β-blockers on outcome of patients with Chagas' cardiomyopathy with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2011;151:205–8.
- Bestetti RB, Cardinali-Neto A. Sudden cardiac death in Chagas' heart disease in the contemporary era. *Int J Cardiol* 2008;131:9–17.
- Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas cardiomyopathy—where do we stand after a hundred years? *Prog Cardiovasc Dis* 2010;52:300–16.
- Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, 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(Suppl 1):252–8.
- 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.
- Szpakowska M, Fievez V, Arumugam K, van Nuland N, Schmitz JC, Chevigné A. Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors. *Biochem Pharmacol* 2012;84:1366–80.

- [8] Calzada JE, Nieto A, Beraún Y, Martín J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 2001;58:154-8.
- [9] Fernández-Mestre MT, Montagnani S, Layrisse Z. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease? *Hum Immunol* 2004;65:725-8.
- [10] Flórez O, Martín J, González CI. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Hum Immunol* 2012;73:852-8.
- [11] Theodoropoulos TAD, Bestetti RB, Otaviano AP, Cordeiro JA, Rodrigues VC, Silva AC. Predictors of all-cause mortality in chronic Chagas' heart disease in the current era of heart failure therapy. *Int J Cardiol* 2008;128:22-9.
- [12] Dutra OP, Besser HW, Tridapalli H, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia, II Brazilian guideline for severe heart disease. *Arq Bras Cardiol* 2006;87:223-32.
- [13] Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996;2:1240-3.
- [14] McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. *Lancet* 1998;352:866-70.
- [15] Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86:367-77.
- [16] Wu L, Paxton WA, Kassam N, et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med* 1997;185:1681-91.
- [17] Shieh B, Liao YE, Hsieh PS, Yan YP, Wang ST, Li C. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4. *Int Immunol* 2000;12:1311-8.
- [18] Mummidi S, Bamshad M, Ahuja SS, et al. Evolution of human and non-human primate CC chemokine receptor 5 gene and mRNA. Potential roles for haplotype and mRNA diversity, differential haplotype-specific transcriptional activity, and altered transcription factor binding to polymorphic nucleotides in the pathogenesis of HIV-1 and simian immunodeficiency virus. *J Biol Chem* 2000;275:18946-61.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jccard.2014.07.043>

0167-5273/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Genetic susceptibility to cardiac and digestive clinical forms of chronic Chagas disease: involvement of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism

***CCR5* in clinical forms of Chagas disease**

Amanda Priscila de Oliveira¹, Cássia Rubia Bernardo¹, Ana Vitória da Silveira Camargo¹, Luiz Sérgio Ronchi², Aldenis Albaneze Borim², João Gomes Netinho², Eumildo de Campos Júnior³, Cinara de Cássia Brandão de Mattos¹, Carlos Eugênio Cavasini⁴, Reinaldo Bulgarelli Bestetti⁵, Luiz Carlos de Mattos¹

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

²Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

³Departamento de Cirurgia Geral, Fundação Faculdade Regional de Medicina - Hospital de Base, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5544, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁴Centro de Investigação de Microrganismos, Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁵Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Address correspondence to: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos - E-mail: luiz.demattos@famerp.br - Laboratório de Imunogenética - Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 - São José do Rio Preto, SP – Brazil - Fone: 55 17 3201-5857 / Fax: 55 17 3229-1777.

Potential conflicts of interest. All authors: No conflict.

Financial support. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [grant numbers #2011/08075-4, #2011/19439-7, #2012/20735-2 and #2012/05580-2] and Brazilian Ministry of Education – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil, PhD Scholarship.

ABSTRACT

Background: The clinical manifestations of chronic Chagas disease include the cardiac form of the disease and the digestive form. Not all the factors that act in the variable clinical course of this disease are known. This study investigated whether the *CCR5*Δ32 (rs333) and *CCR5* 59029 A/G (promoter region - rs1799987) polymorphisms of the *CCR5* gene are associated with different clinical forms of chronic Chagas disease and with the severity of left ventricular systolic dysfunction in patients with chronic Chagas heart disease (CCHD).

Methods: The antibodies anti- *T.cruzi* were identified by ELISA. PCR and PCR-RFLP were used to identify the *CCR5*Δ32 and *CCR5* 59029 A/G polymorphisms. The chi-square test was used to compare variables between groups.

Results: There was a higher frequency of the *AA* genotype in patients with CCHD compared with patients with the digestive form of the disease and the control group. The results also showed a high frequency of the *AG* genotype in patients with the digestive form of the disease compared to the other groups.

Conclusions: In conclusion, the *CCR5*Δ32 polymorphism does not seem to influence the different clinical manifestations of Chagas disease. Our data suggest the involvement of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism in susceptibility to the different forms of chronic Chagas disease. Besides, these polymorphisms do not influence left ventricular systolic dysfunction in patients with CCHD.

Keywords: *CCR5*; *CCR5*Δ32 polymorphism; Chagas disease; chemokine receptor; megaesophagus; chronic Chagas heart disease; megacolon; biomarkers; genetic markers; CC chemokine receptor 5; *CCR5* Receptor; *CCR5* 59029 A/G; chemokines; cytokines.

Introduction

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is endemic in Latin America and, due to migration, it has spread to other countries [1, 2]. According to the World Health Organization, it is estimated that about 7 million people are infected with *T. cruzi*, especially in Latin America [3]. The clinical manifestations of the disease occur approximately two decades after infection with about 30% of infected individuals developing the cardiac form of the disease, chronic Chagas heart disease (CCHD). In this case, chronic heart failure is the most important clinical manifestation of the disease [4]. Dilation of the esophagus (megaesophagus) and/or colon (megacolon), characteristic of the digestive form of the disease, affect about 10% of infected individuals [1, 2].

The variable clinical course of Chagas disease involves distinct populations of parasites, an inflammatory reaction and host immune response [5]. Genetic variants of cytokines are involved in the different clinical manifestations of the disease [1]. Chemokines are cytokines formed by small proteins that are involved in the recruitment of leukocytes to sites of inflammation. They act via specific receptors belonging to the superfamily of G protein-coupled receptors with seven transmembrane domains [6, 7]. Several types of chemokine receptors are expressed on leukocytes. The CC chemokine receptor 5 (CCR5), ligand of the CCL3, CCL4 and CCL5 chemokines, is expressed by monocytes, macrophages and T lymphocytes, preferentially on T_H1 cells [7, 8].

Different studies have evaluated the role of CCR5 in Chagas disease. One of them reported an increased CCR5 expression in patients with cardiomyopathy compared to individuals with indeterminate form of infection [9]. Another study reported that the reduction in the CCR5 expression correlates to the reduction observed in the cardiac function [10]. Polymorphisms in the *CCR5* gene were associated with CCHD [11-14]. The aim of the present study was to investigate the *CCR5*Δ32 (rs333) and *CCR5* 59029 A/G (promoter region - rs1799987) polymorphisms of the *CCR5* gene in patients with digestive and cardiac forms of chronic Chagas disease and in uninfected individuals with *T. cruzi*. And also, we evaluated the possible association between the genotypes and alleles with the severity of left ventricular systolic dysfunction (LVSD) in patients with CCHD.

MATERIAL AND METHODS

Ethical aspects and patient selection

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Medicine School in São José do Rio Preto (#009/2011). The objectives, laboratory procedures, and all details of the study were explained to the patients and control subjects and those who agreed to participate signed an informed consent form.

Two hundred and forty consecutive male and female patients seen at the Cardiomyopathy Outpatient Service and General Surgery of Hospital de Base of the Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (HB-FUNFARME), São José do Rio Preto, SP, Brazil, were enrolled. The control group consisted of 172 male and female blood donors, with negative serology (hemagglutination and immunofluorescence) for *T. cruzi* recruited at the Blood Bank in São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Blood sampling and diagnosis of Chagas disease

A quantity of 5 mL of peripheral blood were collected by venipuncture from each patient in tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 5 mL of blood in tubes without any anticoagulant. Genomic DNA was extracted from leukocytes. Infection by *T. cruzi* was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer's instructions, performed in duplicate (bioMérieux SA, Brazil).

Seropositive patients underwent clinical evaluation, 12-lead electrocardiogram, 2-dimensional echocardiogram and chest X-rays. Patients were considered to have CCHD when they presented with electrocardiographic or echocardiographic abnormalities consistent with the disease [15]. The echocardiographic abnormality indicative of LVSD was a left ventricular ejection fraction (LVEF) <60% measured by the Teicholz' method. In cases where LVEF could not be measured by this method, a LVEF < 50% at Radionuclide Ventriculography was used to detect LVSD.

Patients were divided in groups according to LVEF; without LVSD was diagnosed in patients with a LVEF $\geq 60\%$, mild LVSD in those with LVEF <60% and $\geq 40\%$, and

severe LVSD in those with LVEF <40%, being the last group defined according to the Brazilian guidelines of severe chronic heart disease [16]. In cases where LVEF was measured by Radionuclide Ventriculography, patients with LVEF >50%, LVEF between 30% and 50% and LVEF <30%, indicated normal left ventricular systolic function, mild to moderate, and severe LVSD, respectively.

After the clinical evaluation, patients suspected of having the digestive form of the disease were submitted to anorectal manometry, X-ray of the opaque enema, esophageal manometry and X-ray of the esophagus to confirm the diagnosis. Patients with a mixed form of the disease (cardiac and digestive forms) were excluded.

Genomic DNA extraction and genotyping of the *CCR5* gene

Genomic DNA was extracted using the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA was quantified and its purity determined by the optical densitometry 260/280 nm ratio in a spectrophotometer (Biotek Instruments™ -Epoch®).

Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed using the *CCR5c* (5'-CAA AAA GAA GGT CTT CAT TAC ACC-3') and *CCR5d* primers (5'-CCT GTG CCT CTT CTT CTC ATT TCG-3') to identify the deletion of 32 base pairs of the *CCR5* gene (*CCR5Δ32*). The PCR conditions were performed as described by Huang et al. [17].

Each reaction had a final volume of 25 μL containing 3.0 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dGTP], 20 pM of each primer, 1 unit of Taq polymerase (Invitrogen) and 2 μL of genomic DNA (100 ng/μL). Amplification conditions were: 40 cycles with the first five cycles at 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, 72°C for 1.5 minutes, followed by 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 61°C for 30 seconds, and 72°C for 45 seconds. The PCR product was observed by gel electrophoresis in 1.2% agarose stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. The fragment of 189 base pairs corresponds to the *CCR5* wild allele and that of 157 base pairs corresponds to the deletion allele.

The methodology used to identify the *CCR5* 59029 A/G polymorphism (promoter region of the *CCR5* gene) was Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). The promoter region of the *CCR5* gene was amplified using the sense (5'-CCC GTG AGC CCA TAG TTA AAA CTC-3') and antisense primers (5'-TCA CAG GGC TTT TCA ACA GTA AGG-3'). The conditions of the PCR-RFLP technique were performed as described by McDermott et al. [18].

Each reaction had a final volume of 25 μ L containing 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP [dATP, dTTP, dCTP, dGTP], 20 pM of each primer, 0.5 unit of Taq polymerase (Invitrogen) and 2 μ L of genomic DNA. Each amplification reaction consisted of one cycle at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles at 95°C for 1 minute, 54°C for 1 minute, 72°C for 1 minute and a cycle of 72°C for 10 minutes. The PCR product containing 268 base pairs was observed by gel electrophoresis in 2% agarose stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

The amplified DNA was digested at 37°C for 30 minutes using the Fast Digest enzyme Bsp1286I (Fermentas-Thermo Scientific). The fragments of 10 base pairs and 258 base pairs correspond to the *A* allele while the fragments of 10, 127 and 131 base pairs correspond to the *G* allele. The fragments were observed by gel electrophoresis in 2% agarose stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

Statistical analysis

Quantitative variables are expressed as mean, median and standard deviation. The unpaired t-test was used to compare continuous variables.

The genotype frequencies were evaluated using the recessive inheritance model (*AA* vs. *AG* + *GG*) and the dominant inheritance model (*AA* + *AG* vs. *GG*). Statistical calculations were performed using GraphPad InStat software (version 3.06). The chi-square test was used to compare proportions between groups, adopting a level of significance of 5%. The Hardy-Weinberg equilibrium was calculated using the BioEstat software (version 5.3).

RESULTS

Of the 240 patients with positive serology for *T. cruzi*, 130 (54.2%) were female and 110 (45.8%) were male. The overall mean age was 64.7 ± 10.9 (median: 65.5; Range: 31-93). One hundred and nine (45.4%) of the patients had the digestive form of Chagas disease and 131 (54.6%) had CCHD.

The control group consisted of 172 subjects; 90 (52.3%) were female and 82 (47.7%) were male. The overall mean age was 31.5 ± 11.0 (median: 30.0; range: 18-64).

The difference between the mean age of patients with chronic Chagas disease (64.7 ± 10.9) and the control group (31.5 ± 11.0) was statistically significant ($p < 0.0001$).

The genotype frequencies for the *CCR5* Δ 32 polymorphism among the 240 patients were 223 (92.9%) with *CCR5/CCR5* and 17 (7.1%) with *CCR5/CCR5* Δ 32. The *CCR5* Δ 32/*CCR5* Δ 32 genotype was not observed in the group of patients. The control group also showed a high frequency of the *CCR5/CCR5* genotype; one individual was homozygous for the *CCR5* Δ 32/*CCR5* Δ 32 genotype. Table 1 shows the comparison of genotypes and alleles of the *CCR5* Δ 32 polymorphism between patients and controls. The distribution of the genotypes of the *CCR5* Δ 32 polymorphism was in Hardy-Weinberg equilibrium in all the three study groups (Digestive Disease: $\chi^2 = 0.060$, degrees of freedom [DF] = 1, $p = 0.806$; Heart Disease: $\chi^2 = 0.302$, DF = 1, $p = 0.583$; Control Group: $\chi^2 = 0.886$, DF = 1, $p = 0.346$).

Genotyping of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism was performed in 219 patients with chronic Chagas disease. In all patients, the frequencies of the *AA*, *AG*, and *GG* genotypes were 68 (31.1%), 91 (41.5%) and 60 (27.4%), respectively. In the control group, the genotype frequencies were respectively 47 (28.1%), 74 (44.3%) and 46 (27.5%) for the *AA*, *AG* and *GG*. The distribution of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium in patients with digestive disease ($\chi^2 = 0.001$; DF = 1; $p = 0.979$) and in the control group ($\chi^2 = 2.160$; DF = 1; $p = 0.142$) whereas for the group of patients with CCHD it was out of Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 10.722$; DF = 1; $p = 0.001$). The genotype and allele frequencies of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism are shown in Table 2.

A significant difference was found on using the recessive inheritance model (*AA* vs. *AG* + *GG*) to compare the genotype frequencies between patients with digestive and cardiac

forms of chronic Chagas disease, and the control group ($p= 0.036$ - Table 3). However, no significant difference was observed in the dominant inheritance model ($AA + AG$ vs. GG), between the same groups ($p= 0.998$ - Table 4).

Among patients with CCHD, 66 (50.4%) patients had normal left ventricular systolic function, 30 (22.9%) mild to moderate LVSD, and 35 (26.7%) severe LVSD. Table 5 and table 6 shows the comparison of genotypes and alleles of the $CCR5\Delta32$ and $CCR5$ 59029 A/G polymorphisms between patients with CCHD classified according with the severity of LVSD, respectively.

DISCUSSION

The aim of this study was to investigate the association of the $CCR5\Delta32$ and $CCR5$ 59029 A/G polymorphisms in patients with digestive and cardiac forms of chronic Chagas disease. The different clinical courses of Chagas disease are associated with the inflammatory reaction and differences in host immune response[5]. Studies were conducted to investigate the role of $CCR5$ in the pathogenesis of Chagas disease [9, 10]. However, this seems to be the first study evaluating these two $CCR5$ polymorphisms in the different clinical forms of chronic Chagas disease.

There was a statistically significant difference in respect to age, with the mean age of the patients in this study being higher than the mean age of the control group. In fact, individuals infected with *T. cruzi* develop the chronic forms of Chagas disease about two decades after infection [2], which contributes to the high mean age of patients. Moreover, healthy individuals with ages between 18 and 67 years are two requisites for blood donation [19], which results in a younger population compared to the patients.

The $CCR5\Delta32$ genetic variant results from the deletion of 32 base pairs in the $CCR5$ gene, which generates a truncated protein that is missing from the cell surface. In heterozygous individuals, the expression of the $CCR5$ receptor is reduced [20, 21]. The differences in the distribution of genotypes and alleles of the $CCR5\Delta32$ polymorphism between patients with CCHD and digestive disease, and the control group were not statistically significant. This lack of association may be due to the low frequency of the $CCR5\Delta32$ allele in the population studied. The frequency of this allele is high in European populations, however its frequency in Amerindian populations is rare or

absent [22, 23]. A study carried out in Brazil also revealed a low frequency of the *CCR5Δ32* allele and absence of individuals homozygous for this deletion [24]. It is worthwhile to mention that other studies found a low prevalence of the *CCR5Δ32* allele in patients with Chagas disease [11, 13].

Although the mobilization of immune cells is essential to reduce the parasitic load, the high production of chemokines as well as the expression of their receptors induces migration of large numbers of inflammatory cells into the myocardium, which act as an effector of heart damage [25, 26]. In digestive Chagas disease, there is an association of inflammatory infiltration and fibrosis with lesions found in muscle cells. Immunological differences from the host are involved in the different clinical manifestations of disease [5]. The *CCR5Δ32* polymorphism appears do not be involved in differential immune response between patients with digestive and cardiac disease. Therefore, the results of the current study suggest that the *CCR5Δ32* polymorphism does not influence the differential clinical manifestation of chronic Chagas disease.

The *CCR5Δ32* polymorphism was analyzed in patients with CCHD [11-13, 27]. Although the differences were not statistically significant, a study in Venezuela suggested a protective role for the *CCR5/CCR5Δ32* genotype in development of cardiomyopathy [12]. To date, the *CCR5Δ32* polymorphism has not been evaluated in Chagas digestive disease.

The results of the investigation of the polymorphism of the *CCR5* promoter region (*CCR5* 59029 A/G) identified a higher frequency of the *AA* genotype in patients with CCHD compared with those with chronic Chagas digestive disease and the control group. This difference is evident on comparing the groups using the recessive inheritance model. The results of this study also show a higher frequency of the *AG* genotype in patients with the digestive form of the disease than those of the other groups. This polymorphism affects the *CCR5* level of expression on cell surface. Individuals with the *AA* genotype have greater expression of *CCR5* on the surface of leukocytes compared with other genotypes, as the *G* allele has less promoter activity in vitro than the *A* allele [18, 28].

In CCHD, B and T lymphocytes, macrophages and few NK cells are the major infiltrating cells being the CD8⁺ T cells the predominant cell population [25]. CD4⁺ T_H1 cells are involved in differentiation and activation of CD8⁺ T cells [29].

The expression of chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 was reported during the acute and chronic stages of infection by *T. cruzi* [30]. CCL4 attracts preferably the CD4⁺ T cells while CCL3 predominantly attracts CD8⁺ T cells [31]. In mice infected with *T. cruzi*, the contribution of CCL5 to the infiltration of CD8⁺ T cells was demonstrated [32]. In fact, these CC chemokines attract preferably activated CD8⁺ T lymphocytes resulting in increased number of these cells in the heart of mice infected with *T. cruzi* [33]. It was observed high proportion of CD8⁺ T cells expressing CCR5 in mice infected by *T. cruzi* [34]. Also, it was observed high expression of CCR5 in CD8⁺ T cells in the peripheral blood of infected patients [10]. Together with the expression profile of chemokines, CCR5 may play a role in the predominance of CD8⁺ T cells in the myocardium. Thus, the *AA* genotype may contribute to the intense inflammatory infiltrate and predominance of CD8⁺ T cells in heart of patients infected by *T. cruzi* favoring the development of Chagas myocarditis.

The composition of the inflammatory infiltrate in the digestive form of Chagas disease includes macrophages, mast cells, eosinophils, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, B cell and NK lymphocytes being the CD4⁺ T cells most abundant in comparison to CD8⁺ T cells [5, 35-37]. In humans, it was demonstrated a higher percentage of CD8⁺ T cells expressing CCR5 in relation to CD4⁺ T cells [38]. The elevated frequency of *AG* genotype in patients with digestive disease observed in this study suggests a reduced inflammatory process dependent of CCR5, in comparison to cardiac form of the Chagas disease. Thus, the inflammatory activity in the digestive form of the disease may be less dependent on the CCR5 receptor and its ligands than that observed in the CCHD.

Denervation is the main pathophysiological mechanism of digestive chronic Chagas disease which plays an important role in the formation of megaesophagus and megacolon. The causes of the reduction in the number of neurons remain unclear [5]. High number of mast cells and eosinophils were observed in patients with megacolon and these cells together with macrophages were correlated with the occurrence of fibrosis in the colon of these patients. In this same study, eosinophils were associated

with the damaged neuronal ganglia [37]. Mononuclear cells, eosinophils and mast cells were also present in the inflammatory infiltrate of patients with megaesophagus. Besides, ganglionitis, periganglionitis and vasculitis were also demonstrated in these patients [36]. Although association of CD8⁺ T cells with degenerated ganglion cells has been reported in patients with megacolon [39] these seem do not be the predominant cells [35]. Of course, there are other pathophysiological mechanisms and other cells involved in the pathogenesis of digestive Chagas disease.

The *CCR5* 59029 A/G polymorphism was associated with protection in the development of Chagas cardiomyopathy [11, 12]. Calzada et al. [11] suggested an association of the *G* allele with protection against chagasic cardiomyopathy. The results of another study suggest that the *GG* genotype has a protective role in the development of cardiomyopathy related to *T. cruzi* infection [12]. In contrast to the results of this study and the results mentioned above, Flórez et al. [13] revealed the presence of the *G* allele in the haplotype associated with the susceptibility to the chagasic cardiomyopathy. The *CCR5* 59029 A/G polymorphism has not been studied in the digestive form of chronic Chagas disease.

The differences in the distribution of genotypes and alleles of the *CCR5*Δ32 and *CCR5* 59029 A/G polymorphisms between patients with CCHD evaluated according to the degree of LVSD were not statistically significant. The results this study are consistent with the results reported another recent study by our group. We investigated these polymorphisms among patients with CCHD with and without LVSD, and found no association between *CCR5*Δ32 and *CCR5* 59029 A/G polymorphisms and left ventricle impairment [27]. Although Talvani et al. [10] found that with the presence of cardiac dysfunction, there was a decrease in *CCR5* expression, the *CCR5* 59029 A/G polymorphism does not appear to be associated with the severity of CCHD, but with the differential clinical manifestation of the heart and digestive forms.

The expression of *CCR5* was evaluated in Chagas disease. Gomes et al. [9] showed a lower expression of *CCR5* in patients with an indeterminate form of the disease compared with patients with cardiomyopathy. These authors support the hypothesis that the development of heart disease is associated with an increased T_H1-type immune response in particular [9]. In another study with mice, treatment with Met-RANTES (N-

terminal-methionylated RANTES) in the chronic phase of *T. cruzi* infection resulted in reductions in the damage to heart tissue and in dysfunction [40]. In addition, a study of cardiac tissue of beagle dogs infected with *T. cruzi*, suggested that high expression of CCR5 mRNA and myocarditis may be correlated [41].

In this study, for the group of CCHD patients, unlike the control group, the distribution of the genotypes of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism is out of Hardy-Weinberg equilibrium. Although some authors argue that both groups should be in Hardy-Weinberg equilibrium [42], others argue that this equilibrium should only be investigated in the control group as it represents the general population [43-45]. Therefore, the high frequency of the *AA* genotype might be changing the distribution of this polymorphism in individuals with heart disease, resulting in a deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium.

Despite the current knowledge on the CCR5 receptor especially in cardiac form of chronic Chagas disease, the role of polymorphisms *CCR5*Δ32 and *CCR5* 59029 A/G in different clinical forms of the disease still needs further clarification, especially due to the small number of patients enrolled in this study.

According to our results, the *CCR5*Δ32 polymorphism does not seem to influence the different clinical manifestations of Chagas disease. The results of this study show the involvement of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism in susceptibility to chronic forms of Chagas disease in the population studied. In conclusion, our results show that the *AA* genotype is associated with the CCHD and the genotype *AG* is associated with digestive form of chronic Chagas disease. Besides, these polymorphisms do not influence LVSD in patients with CCHD.

Acknowledgements

Many thanks to David Hewitt to proofread the English. Many thanks to Professor Stephen Henry from Auckland University of Technology to provide library access.

Present address of Dr. Reinaldo Bulgarelli Bestetti: Universidade de Ribeirão Preto, Departamento de Medicina. Av. Costábile Romano, 2201, Centro, 14096-900 - Ribeirão Preto, SP – Brazil.

References

1. Ayo CM, Dalalio MM de O, Visentainer JEL, Reis PG, Sippert EÂ, Jarduli LR et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *BioMed research international* 2013, 2013:284729.
2. Bestetti RB, Restini CBA. Precordial chest pain in patients with chronic Chagas disease. *International journal of cardiology* 2014, 176:309–14.
3. World Health Organization (2015) Chagas disease (American trypanosomiasis): Fact Sheet No 340.
4. Bestetti RB, Otaviano AP, Cardinalli-Neto A, da Rocha BF, Theodoropoulos TA, Cordeiro JA. Effects of B-Blockers on outcome of patients with Chagas' cardiomyopathy with chronic heart failure. *International journal of cardiology* 2011, 151:205-8.
5. Dutra WO, Menezes CAS, Villani FNA, da Costa GC, da Silveira ABM, Reis D d'Avila et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009, 104 Suppl :208–18.
6. Proudfoot AEI. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature reviews Immunology* 2002, 2:106–15.
7. Szpakowska M, Fievez V, Arumugan K, van Nuland N, Schmit J-C, Chevigné A. Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors. *Biochemical pharmacology* 2012, 84:1366–80.
8. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annual review of immunology* 2000, 18:593–620.

9. Gomes JAS, Bahia-Oliveira LMG, Rocha MOC, Busek SCU, Teixeira MM, Silva JS et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infection and immunity* 2005, 73:7960–6.
10. Talvani A, Rocha MOC, Ribeiro AL, Correa-Oliveira R, Teixeira MM. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. *The Journal of infectious diseases* 2004, 189:214–20.
11. Calzada JE, Nieto A, Beraún Y, Martín J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue antigens* 2001, 58:154–8.
12. Fernández-Mestre MT, Montagnani S, Layrisse Z. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease? *Human immunology* 2004, 65:725–8.
13. Flórez O, Martín J, González CI. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Human immunology* 2012, 73:852–8.
14. Machuca MA, Suárez EU, Echeverría LE, Martín J, González CI. SNP/haplotype associations of CCR2 and CCR5 genes with severity of chagasic cardiomyopathy. *Human immunology* 2014, 75:1210–5.
15. Bestetti RB, Cardinalli-Neto A. Sudden cardiac death in Chagas' heart disease in the contemporary era. *International journal of cardiology* 2008, 131:9–17.
16. Dutra OP, Besser HW, Tridapalli H, Leiria TL, Afiune Neto A, Simão AF et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia, II Brazilian guideline for severe heart disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2006, 87:223–32.
17. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature medicine* 1996, 2:1240–3.

18. McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 1998, 352:866–70.
19. Portaria nº 1353, de 13 de junho de 2011
[<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Sangue+Tecidos+e+Orgaos/Assunto+de+Interesse/Publicacoes+e+Apresentacoes/Legislacao/Portaria+n+1353+de+13+de+junho+de+2011>]
20. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996, 86:367-77.
21. Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *The Journal of experimental medicine* 1997, 185:1681–91.
22. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nature genetics* 1997, 16:100–3.
23. Mangano A, Theiler G, Sala L, Capucchio M, Fainboim L, Sen L. Distribution of CCR5-Delta 32 and CCR2-64I alleles in an Argentine Amerindian population. *Tissue antigens* 2001, 58:99–102.
24. Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Chies JAB. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2006, 39:321–5.
25. 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009, 104 Suppl :252–8.
26. Gutierrez FR, Guedes PM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite immunology* 2009, 31:673-85.

27. Oliveira AP, Bernardo CR, Camargo AVS, Villafanha DF, Cavasini CE, de Mattos CCB et al. CCR5 chemokine receptor gene variants in chronic Chagas' disease. *International journal of cardiology* 2014, 176:520–2.
28. Shieh B, Liao YE, Hsieh PS, Yan YP, Wang ST, Li C. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4. *International immunology* 2000, 12:1311–8.
29. Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *International archives of allergy and immunology* 1997, 114:103-10.
30. Dos Santos P V, Roffê E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN et al. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2001, 3:971–84.
31. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science (New York, NY)* 1993, 260:355–8.
32. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in parasitology* 2002, 18:262–5.
33. Marino APMP, Silva AA, Santos PVA, Pinto LMO, Gazzinelli RT, Teixeira MM et al. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2005, 100 Suppl :93–6.
34. Marino APMP, da Silva A, dos Santos P, Pinto LM de O, Gazzinelli RT, Teixeira MM et al. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation* 2004, 110:1443–9.

35. Corrêa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, Cardoso GM, Reis DD, Adad S et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999, 94 Suppl 1:253–5.
36. Da Silveira ABM, Arantes RME, Vago AR, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R et al. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology* 2005, 131(Pt 5):627–34.
37. Da Silveira ABM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D. Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. *Parasitology* 2007, 134(Pt 6):789–96.
38. Mack M, Brühl H, Gruber R, Jaeger C, Cihak J, Eiter V et al. Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis. *Arthritis and rheumatism* 1999, 42:981–8.
39. Corbett CE, Ribeiro U, Prianti MG, Habr-Gama A, Okumura M, Gama-Rodrigues J. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. *Diseases of the colon and rectum* 2001, 44:993–8.
40. Medeiros GA, Silvério JC, Marino APMP, Roffê E, Vieira V, Kroll-Palhares K et al. Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2009, 11:264–73.
41. Guedes PMM, 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. *Veterinary immunology and immunopathology* 2010, 138:106–13.
42. Kimura A. Departure from the Hardy–Weinberg equilibrium. *Gene* 2014, 537:357.

43. Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Human genetics* 2002, 111:573–4.
44. Llorca J, Prieto-Salceda D, Combarros O, Dierssen-Sotos T, Berciano J. [Competing risks of death and Hardy-Weinberg equilibrium in case-control studies of gene-disease association]. *Gaceta sanitaria / SESPAS* 2005, 19:321–4.
45. Li M, Li C. Assessing departure from Hardy-Weinberg equilibrium in the presence of disease association. *Genetic epidemiology* 2008, 32:589–99.

Table 1. Frequency of genotypes and alleles of the *CCR5*Δ32 polymorphism in patients with chronic Chagas disease and control subjects.

Genotypes	Digestive		Cardiac		Control		χ^2	DF ^a	p ^b
	form		form						
<i>CCR5</i> Δ32	n	%	n	%	n	%			
<i>CCR5/CCR5</i>	104	95.4	119	90.8	156	90.7	2.358	2	0.307
<i>CCR5/CCR5</i> Δ32	5	4.6	12	9.2	15	8.7	2.112	2	0.348
<i>CCR5</i> Δ32/ <i>CCR5</i> Δ32	0	0	0	0	1	0.6	1.399	2	0.497
Total	109	100.0	131	100.0	172	100.0			
Alleles									
<i>CCR5</i>	213	97.7	250	95.4	327	95.1	2.566	2	0.277
<i>CCR5</i> Δ32	5	2.3	12	4.6	17	4.9			

^a DF: Degrees of freedom; ^b Calculated by χ^2 .

Table 2. Frequency of genotypes and alleles of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism in patients with chronic Chagas disease and control subjects.

Genotypes	Digestive form		Cardiac form		Control		χ^2	DF ^a	p ^b
	n	%	n	%	n	%			
<i>CCR5</i>									
59029A/G									
<i>AA</i>	22	22.4	46	38.0	47	28.1	6.656	2	0.036
<i>AG</i>	49	50.0	42	34.7	74	44.3	5.466	2	0.065
<i>GG</i>	27	27.6	33	27.3	46	27.5	0.003	2	0.998
Total	98	100.0	121	100.0	167	100.0			
<i>AA</i>	22	22.4	46	38.0			6.129	1	0.013
<i>AG</i>	49	50.0	42	34.7			5.212	1	0.022
<i>GG</i>	27	27.6	33	27.3			0.002	1	0.963
Alleles									
<i>A</i>	93	47.4	134	55.4	168	50.3	2.897	2	0.235
<i>G</i>	103	52.6	108	44.6	166	49.7			
Genotype comparisons									
Digestive form vs. cardiac form							7.274	2	0.026
Digestive form vs. control group							1.200	2	0.549
Cardiac form vs. control group							3.725	2	0.155

^a DF: Degrees of freedom; ^b Calculated by χ^2 .

Table 3. *CCR5* 59029 A/G polymorphism analysis using the recessive inheritance model.

Genotypes	Digestive form		Cardiac form		Control		χ^2	DF ^a	p ^b
	n	%	n	%	n	%			
<i>CCR5</i>	n	%	n	%	n	%			
59029A/G									
<i>AA</i>	22	22.4	46	38.0	47	28.1	6.656	2	0.036
<i>AG + GG</i>	76	77.6	75	62.0	120	71.9			
Total	98	100.0	121	100.0	167	100.0			
Genotype comparisons									
Digestive form vs. Cardiac form							6.129	1	0.013
Digestive form vs. control group							1.040	1	0.308
Cardiac form vs. control group							3.128	1	0.077

^a DF: Degrees of freedom; ^b Calculated by χ^2 .

Table 4. *CCR5* 59029 A/G polymorphism analysis using the model of dominant inheritance.

Genotypes	Digestive form		Cardiac form		Control		χ^2	DF ^a	p ^b
	n	%	n	%	n	%			
<i>CCR5</i>	n	%	n	%	n	%			
59029A/G									
<i>AA + AG</i>	71	72.4	88	72.7	121	72.5	0.003	2	0.998
<i>GG</i>	27	27.6	33	27.3	46	27.5			
Total	98	100.0	121	100.0	167	100.0			
Genotype comparisons									
Digestive form vs. cardiac form							0.002	1	0.963
Digestive form vs. control group							1.155	1	0.999
Cardiac form vs. control group							0.003	1	0.959

^a DF: Degrees of freedom; ^b Calculated by χ^2 .

Table 5. Frequency of genotypes and alleles of the *CCR5*Δ32 polymorphism in patients with chronic Chagas heart disease with normal left ventricular systolic function, mild to moderate, and severe left ventricular systolic dysfunction.

Genotypes	Normal		Mild/Moderate		Severe		χ^2	DF ^a	p ^b
	LVSD								
	n	%	n	%	n	%			
<i>CCR5</i> Δ32									
<i>CCR5/CCR5</i>	61	92.4	28	93.3	30	85.7	1.528	2	0.466
<i>CCR5/CCR5</i> Δ32	5	7.6	2	6.7	5	14.3			
Total	66	100.0	30	100.0	35	100.0			
Alleles									
<i>CCR5</i>	127	96.2	58	96.7	65	92.9	1.455	2	0.483
<i>CCR5</i> Δ32	5	3.8	2	3.3	5	7.1			

LVSD: Left ventricular systolic dysfunction; ^aDF: Degrees of freedom; ^b Calculated by

χ^2 .

Table 6. Frequency of genotypes and alleles of the *CCR5* 59029 A/G polymorphism in patients with chronic Chagas heart disease with normal left ventricular systolic function, mild to moderate, and severe left ventricular systolic dysfunction.

Genotypes	Normal		Mild/Moderate		Severe LVSD		χ^2	DF ^a	p ^b
	n	%	n	%	n	%			
LVSD									
<i>CCR5</i>	n	%	n	%	n	%			
<i>59029A/G</i>									
<i>AA</i>	26	41.3	9	32.1	11	36.7	0.716	2	0.699
<i>AG</i>	19	30.1	11	39.3	12	40.0	1.205	2	0.547
<i>GG</i>	18	28.6	8	28.6	7	23.3	0.312	2	0.855
Total	63	100.0	28	100.0	30	100.0			
Alleles									
<i>A</i>	71	56.3	29	51.8	34	56.7	0.381	2	0.827
<i>G</i>	55	43.7	27	48.2	26	43.3			

LVSD: Left ventricular systolic dysfunction; ^a DF: Degrees of freedom; ^b Calculated by χ^2 .

O papel de CCR5 na doença de Chagas – uma revisão sistemática

Amanda P. de Oliveira^a, Christiane M. Ayo^a, Reinaldo B. Bestetti^{b,1}, Cinara C. B. de Mattos^a, Carlos E. Cavasini^c, Luiz C. de Mattos^a

^aLaboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

^bDepartamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

^cCentro de Investigação de Microrganismos, Departamento de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Address correspondence to: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos - E-mail: luiz.carlos@famerp.br - Laboratório de Imunogenética - Departamento de Biologia Molecular- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 - São José do Rio Preto, SP – Brazil – Fone: 55 17 3201 5854/Fax: 55 17 3229 1777.

RESUMO: A doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. As manifestações clínicas dessa doença são representadas pelas seguintes formas: indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista. A variabilidade genética do parasito e do hospedeiro está envolvida na patogênese dessa enfermidade. Polimorfismos de genes envolvidos na resposta imunológica podem estar envolvidos no variável curso clínico da doença. As citocinas exercem papel fundamental na regulação da resposta imune, em particular as quimiocinas, por exercer função crucial no controle de migração dos leucócitos durante a resposta do hospedeiro frente ao processo infeccioso. Além disso, a participação das citocinas e quimiocinas inflamatórias na geração do infiltrado inflamatório e no dano tecidual foi relatada. O envolvimento do receptor para quimiocinas CCR5 na migração de leucócitos para os locais de inflamação já foi elucidado e este receptor já foi investigado na doença de Chagas. Aqui nós revisamos o papel de CCR5 na infecção por *T. cruzi*, bem como sua importância na patogênese da doença.

Palavras-chave: doença de Chagas; Cardiopatia Chagásica Crônica; CCR5; polimorfismo genético.

1. Introdução

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, descrita por Carlos Chagas em 1909, é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido aos seres humanos pelas fezes de um inseto triatomíneo pertencente à família Reduviidae. É endêmica na América Latina e representa relevante problema de saúde pública nessa região (Ayo et al., 2013). Há estimativa que cerca de 7 milhões de pessoas estejam atualmente infectadas pelo *T. cruzi* principalmente na região endêmica, com risco de desenvolverem as formas crônicas da doença (WHO, 2015). Devido a imigrações internacionais a infecção tem sido disseminada pelo mundo, em regiões dos Estados Unidos, Europa, Ásia e Oceania (Coura, 2014).

A transmissão do *T. cruzi* ao homem pode ocorrer por diversos mecanismos, como por meio de insetos vetores, transfusões sanguíneas, congenitamente e pela ingestão de caldo de cana e açaí contaminados com *T. cruzi*. Acidentes de laboratório e transplantes de órgãos são outras formas de transmissão conhecidas como secundárias (Rassi et al., 2010; Ayo et al., 2013). Os insetos vetores da doença de Chagas são os triatomíneos da família Reduviidae, em que o *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus*, são os mais significantes epidemiologicamente (Bellini et al., 2012).

A doença de Chagas apresenta duas fases, a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda dura 30 dias em média; 95% dos pacientes sobrevivem a este período, e entram na fase crônica porque não há cura espontânea. Cerca de 60% dos indivíduos cronicamente infectados permanecem assintomáticos, sem evidência de doença cardíaca

ou do trato digestivo, mas com sorologia reagente para o *T. cruzi*. Este período de infecção é designado de fase indeterminada da doença de Chagas crônica. Aproximadamente 10% dos pacientes na fase indeterminada da doença de Chagas crônica progridem para a Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC), anualmente (Espinosa et al., 1985).

Dessa forma, cerca de 30% dos pacientes cronicamente infectados irão desenvolver CCC, e 10% doença do trato digestivo aproximadamente 20 anos após a infecção inicial (Taylor e Bestetti, 2009). As manifestações clínicas da CCC são representadas por fenômenos tromboembólicos (Carod-Artal, 2005), arritmias ventriculares (Bestetti and Cardinalli-Neto, 2008), insuficiência cardíaca crônica (Bestetti et al., 2011), morte súbita cardíaca (Bestetti and Cardinalli-Neto, 2008) e dor no peito precordial (Bestetti and Restini, 2014).

O comprometimento do sistema nervoso autônomo, mecanismos imunológicos, a persistência do *T. cruzi* no miocárdio e alterações da microcirculação são os principais mecanismos patogênicos envolvidos na cardiopatia, embora a patogênese desta doença não esteja totalmente estabelecida (Cunha-Neto et al., 2009; Biolo et al., 2010). Outra característica patológica importante é a presença de um intenso infiltrado inflamatório no miocárdio, o qual age como efector dos danos cardíacos (Cunha-Neto et al., 2009; Ayo et al., 2013).

2. Fatores do hospedeiro e sua influência no curso clínico doença de Chagas

A doença de Chagas humana possui uma apresentação clínica extremamente variável, e os fatores que atuam direta ou indiretamente no aparecimento das lesões produzidas pelo *T. cruzi* são inúmeros. Em parte, podem ser explicados por aspectos

ambientais e nutricionais, mas também pela variabilidade genética do parasito e por uma base genética de suscetibilidade do hospedeiro (Macedo et al., 2004).

Dentre os aspectos relacionados ao hospedeiro, a resposta imunológica é de especial interesse, pois desempenha papel fundamental na defesa do organismo contra o agente infeccioso determinando o aparecimento de lesões que caracterizam as diferentes formas clínicas desta doença, uma vez que tanto no coração quanto no trato digestivo, infiltrações inflamatórias focais decorrentes de atividades celulares são observadas (Brener, 1992, Reis et al., 1993).

Neste sentido, os polimorfismos de genes envolvidos na resposta imunológica estão sendo largamente estudados no intuito de esclarecer suas funções frente ao variável curso clínico da doença de Chagas; entre eles vários trabalhos relataram a importância do papel das citocinas na regulação da resposta imune, em particular as quimiocinas, por exercer função crucial no controle de migração dos leucócitos durante a resposta do hospedeiro frente ao processo infeccioso (Baggiolini, et al., 1997; Rossi e Zlotnik, 2000).

Além disso, o envolvimento das citocinas e quimiocinas inflamatórias na geração do infiltrado inflamatório e no dano tecidual já foi relatado (Cunha-Neto et al., 2009). A suscetibilidade à CCC pode resultar de polimorfismos genéticos de quimiocinas, citocinas e genes envolvidos na resposta imune (Cunha-Neto et al., 2009; Cunha-Neto et al., 2014).

2.1. Receptor para quimiocinas CCR5 e sua influência na doença de Chagas

As quimiocinas e seus receptores estão envolvidos na migração de leucócitos (Sallusto et al., 2000). Quatro famílias de quimiocinas foram descritas de acordo com o número de espaçamento dos aminoácidos existentes nos dois primeiros resíduos de

cisteína da extremidade N-terminal: CC, CXC, XC e CX₃C, onde C representa cisteína e X ou X₃ representa um ou três aminoácidos. Para cada família de quimiocinas descrita existem receptores respectivos: CCR, CXCR, XCR, CX₃CR, acoplados à proteína G, os quais mediarão às funções junto às células-alvo (Baggiolini, et al., 1997; Rossi e Zlotnik, 2000). A identificação de um grande número de receptores de quimiocinas e a caracterização de sua seletividade e expressão em diferentes tipos de leucócitos tem fornecido informações sobre a regulação do tráfego de leucócitos na saúde e em doenças humanas (Baggiolini, et al., 2001).

O gene *CCR5*, localizado no cromossomo 3p21, codifica o receptor para quimiocinas CCR5 (Liu et al., 1996; Barmania e Pepper, 2013) e seus ligantes incluem as quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5 e CCL8 (Szpakowska et al., 2012). O envolvimento de *CCR5* na migração de leucócitos para os locais de inflamação já foi elucidado (de Oliveira et al., 2014). Os monócitos, macrófagos e células T são as células em que este receptor está presente (Sallusto et al., 2000). Polimorfismos genéticos que resultam em variações nos níveis de expressão de *CCR5* foram associados com algumas doenças (Mamtani et al., 2011; Buraczynska et al., 2012).

Vários estudos independentes investigaram *CCR5* na infecção por *T. cruzi* (Machuca et al., 2014; Frade et al., 2013; Nogueira et al., 2012; Flórez et al., 2012; Hardison et al., 2006; Marino et al., 2005). Embora o envolvimento de *CCR5* no controle da replicação do *T. cruzi* tenha sido relatado (Hardison et al., 2006), *CCR5* também foi associado com a patogênese da miocardite chagásica (Marino et al., 2005).

2.2. Estratégia para triagem e seleção dos estudos

Nesta revisão sistemática, procuramos e selecionamos artigos originais realizados em humanos e em modelos experimentais que foram encontrados nas bases

de dados PubMed (US National Library of Medicine) e LILACs (Latin American and Caribbean Center on Information in Health Sciences). No MeSh (Medical Subject Heading) do banco de dados PubMed e no LILACs os termos e os descritores usados foram: “CCR5” OR “CCR5/receptor” AND “Chagas disease” and “CCR5” OR “CCR5/receptor” AND “chronic Chagas cardiomyopathy”. Também foram usados termos livres a fim de recuperar artigos de interesse. Não houve restrição quanto ao idioma e o período da pesquisa restringiu-se ao limite do banco de dados encontrado até julho de 2015.

A triagem nos bancos de dados identificou 27 citações potencialmente relevantes. Destas, 7 foram excluídas após avaliação do título e do resumo (uma por não estar em conformidade com os critérios de inclusão, como polimorfismos ou expressão de CCR5, e 6 por estarem em duplicidade de artigos). 20 artigos foram selecionados e mais três foram incluídos, totalizando 23 artigos originais envolvendo CCR5 em associação com a doença de Chagas e/ou Cardiopatia Chagásica. As principais conclusões dos estudos selecionados estão descritas neste artigo de revisão, e os polimorfismos genéticos de CCR5 também estão apresentados na tabela 1.

2.3. CCR5 e doença de Chagas

Machado et al. (2005) verificaram a expressão das quimiocinas ligantes de CCR5, CCL3, CCL4 e CCL5, no coração de camundongos infectados com *T. cruzi*. O mesmo estudo revelou elevada parasitemia e aumento da mortalidade nos camundongos CCR5^{-/-} comparados com o tipo selvagem. No tecido cardíaco dos camundongos CCR5^{-/-} também foi verificado grande número de parasitos. Esses achados revelam o papel de CCR5 no controle da migração de linfócitos e como também na replicação do parasito.

Hardison et al. (2006) avaliaram a gravidade da doença em camundongos CCR5^{-/-} infectados com *T. cruzi*. Os camundongos CCR5^{-/-} apresentaram elevada parasitemia, além de maior quantidade de parasitos no tecido cardíaco, em comparação com os camundongos CCR5^{+/+}. De acordo com os resultados deste estudo, os autores sugerem o envolvimento de CCR5 no controle da replicação do *T. cruzi* e da inflamação no tecido cardíaco, nos estágios iniciais da doença. Além disso, na fase crônica da infecção, CCR5 não está envolvido na manutenção da inflamação cardíaca (Hardison et al., 2006).

Em outro estudo, foi verificada expressão diferencial de CCR5 nas células mononucleares do sangue periférico entre os pacientes com CCC leve, CCC grave e indivíduos não infectados. Os pacientes com CCC leve apresentaram maior expressão de CCR5 nessas células, comparados com os outros dois grupos. De acordo com os autores, o aparente envolvimento de CCR5 no controle da infecção aguda, sugere que os indivíduos com baixa expressão de CCR5 possam ter progredido para doença grave. E ainda, é possível que quando os pacientes desenvolvem disfunção cardíaca ocorra diminuição da expressão do receptor (Talvani et al., 2004).

Os resultados do trabalho de Gomes et al. (2005) fornecem evidências de que nos pacientes com cardiomiopatia a resposta imune específica do tipo T_H1 é exacerbada. Estes autores demonstraram que a expressão de CCR5 nas células mononucleares do sangue periférico foi mais elevada nos pacientes com cardiomiopatia, comparados com indivíduos com a forma indeterminada da infecção e não infectados.

Nogueira et al. (2012) também verificaram expressão de CCR5 em células mononucleares no miocárdio de pacientes com CCC. No mesmo trabalho, no miocárdio desses pacientes foi observada maior expressão de RNAm para CCR5, em comparação

com pacientes portadores de cardiomiopatias de etiologia não inflamatória e doadores normais.

Em um estudo recente realizado com cães infectados experimentalmente com diferentes formas de *T. cruzi* foi verificado no átrio direito daqueles infectados com a forma tripomastigota sanguínea elevada expressão relativa de RNAm para CCR5, comparados com o grupo não infectado. E ainda, no mesmo estudo, o parasitismo cardíaco e os níveis de expressão do receptor CCR5 foram correlacionados positivamente (de Souza et al., 2014). De acordo com os resultados do trabalho de Kroll-Palhares et al. (2008), na expressão de CCR5 pelos linfócitos TCD8⁺ há o envolvimento da sinalização por TNF/TNFR1, a qual contribui para a inflamação do miocárdio por acúmulo de CD8.

Na fase aguda, cães infectados com as cepas Y e ABC apresentaram maior expressão de CCR5 no tecido cardíaco, comparados com aqueles infectados com a cepa Be-78. Neste estudo, os autores sugerem correlação da expressão aumentada de RNAm para CCR5 com elevada inflamação do miocárdio (Guedes et al., 2010). Resultados de outro estudo sugerem que CCR5 não está envolvido na imunidade protetora da mucosa, em camundongos infectados pelo *T. cruzi* (Sullivan et al. 2011).

Em camundongos infectados, a expressão do receptor CCR5 foi observada em sítios inflamatórios do músculo esquelético e coração (Cutrullis et al., 2009). Em outro estudo, também em camundongos, foi observada expressão elevada de CCR5 nos timócitos e em células T CD4⁺ CD25⁺ (Mendes-da-Cruz et al., 2006; Mariano et al., 2008). Um trabalho envolvendo a interação *T. cruzi* e HIV-1 em macrófagos humanos demonstrou diminuição da expressão de CCR5 causada por tripomastigotas (Andreani et al., 2009).

Marino et al. (2004) verificaram maior expressão de CCR5 no tecido cardíaco de camundongos infectados com *T. cruzi*, como também maior número de células mononucleares do sangue periférico CCR5⁺. No mesmo estudo, camundongos tratados com Met-RANTES apresentaram miocardite reduzida, redução de células CCR5⁺, e menor recrutamento de células T CD4⁺ e T CD8⁺ para o coração.

Os resultados do trabalho de Medeiros et al. (2009) revelaram redução do dano cardíaco e da disfunção após o tratamento com Met-RANTES, em camundongos infectados cronicamente com *T. cruzi*. Os benefícios deste tratamento em relação aos danos cardíacos podem estar associados com a quantidade de células T CD4⁺ reduzida, verificada no coração desses animais.

Marino et al. (2005) apontam o papel de quimiocinas e seus receptores na patogênese da miocardite chagásica, bem como CCR5 e seus ligantes, e mostraram efeitos benéficos do tratamento com Met-RANTES. Esses autores apontam o boqueio da sinalização quimiocinas/receptores como estratégia terapêutica na doença de Chagas. Por outro lado, em outro estudo, o bloqueio de CCR5 em ratos resultou em miocardite intensa, maior parasitismo e fibrose (Roffê et al., 2010). Embora o envolvimento de CCR5 na infecção por *T. cruzi* tenha sido elucidado, não há consenso sobre sua contribuição no controle da replicação deste parasito e na patogênese da doença de Chagas.

2.4. Polimorfismos genéticos de CCR5 na doença de Chagas

Alguns polimorfismos genéticos de CCR5 e haplótipos foram associados com proteção ao desenvolvimento da CCC e outros com suscetibilidade a esta cardiopatia (Tabela 1).

Um estudo realizado com a população brasileira demonstrou associação dos polimorfismos do gene *CCR5* rs3176763 C/A e rs11575815 A/T com a CCC. Neste estudo também foi revelado o papel protetor do genótipo *CCR5* rs3176763 C/C no desenvolvimento da CCC (Frade et al., 2013). Ainda no Brasil, outro estudo investigou o polimorfismo *CCR5* rs1799988 CT nos pacientes com doença de Chagas crônica e o maior risco de desenvolvimento da CCC grave foi atribuído ao alelo C e ao genótipo CC (Nogueira et al., 2012).

Em outro trabalho, o menor risco de desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica foi atribuído à presença do alelo *CCR5* -2733 G, enquanto a menor gravidade dessa doença foi associada com o alelo *CCR5* -2554 T (Flórez et al., 2012). Recentemente alguns SNPs do gene *CCR5* e haplótipos foram associados com a gravidade da CCC, e outros associados com a proteção, em uma área endêmica da Colômbia (Machuca et al., 2014).

2.5. Polimorfismos *CCR5*Δ32 (rs333) e *CCR5* 59029 A/G (rs1799987)

O papel dos polimorfismos *CCR5*Δ32 e *CCR5* 59029 A/G na doença de Chagas foi avaliado por alguns estudos.

No trabalho de Fernández-Mestre et al. (2004), os indivíduos assintomáticos e pacientes com arritmia apresentaram maiores frequências do genótipo *CCR5/CCR5*Δ32 em comparação com os cardiomiopatas, embora as diferenças encontradas não sejam significativas (Fernández-Mestre et al., 2004). Já outros estudos, encontraram baixa frequência do alelo *CCR5*Δ32 nos indivíduos investigados, impossibilitando conclusões sobre sua influência na doença de Chagas (Calzada et al., 2001, Flórez et al., 2012, Oliveira et al., 2014).

Um estudo realizado no Peru revelou maior frequência do polimorfismo *CCR5* 59029 A/G no grupo de pacientes assintomáticos em comparação com os cardiomiopatas, sendo possivelmente associado com papel protetor no desenvolvimento da doença de Chagas crônica cardíaca (Calzada et al., 2001). Outro estudo, realizado na Venezuela, revelou maior frequência do genótipo *CCR5* 59029 G/G nos pacientes assintomáticos, em comparação com os sintomáticos, sugerindo proteção desse genótipo no desenvolvimento dos sintomas da doença de Chagas crônica cardíaca (Fernandez-Mestre et al., 2004).

Por outro lado, em um trabalho realizado na Colômbia, a presença do alelo *CCR5* 59029 G foi observada no haplogrupo humano HHA, o qual está envolvido com suscetibilidade à cardiomiopatia chagásica (Flórez et al., 2012). Outro estudo revelou ausência de associação do polimorfismo *CCR5* 59029 A/G com a disfunção sistólica ventricular esquerda em pacientes brasileiros com doença de Chagas crônica cardíaca (Oliveira et al., 2014).

3. Considerações finais

De acordo com os resultados dos trabalhos aqui apresentados, o papel de *CCR5* na doença de Chagas apresenta duas faces. Por um lado, *CCR5* é essencial no controle da infecção aguda, por outro, a expressão acentuada desse receptor pode contribuir para manutenção da inflamação e causar danos teciduais no miocárdio. Estratégias distintas de avaliação podem ter contribuído na direção dos resultados obtidos.

A variabilidade genética do parasito e do hospedeiro está envolvida na patogênese da doença de Chagas (Macedo et al., 2004). Em relação ao hospedeiro, polimorfismos de genes envolvidos na resposta imune podem estar associados à

suscetibilidade à CCC (Cunha-Neto et al., 2009; Cunha-Neto et al., 2014), e nesse sentido, os polimorfismos genéticos de *CCR5* são de grande interesse. De acordo com Flórez et al. (2012), como a expressão do receptor *CCR5* pode ser influenciada por vários polimorfismos na região promotora do gene, analisar haplótipos seria mais adequado do que variações genéticas individuais.

A intensidade da resposta imune está ligada à patogênese da CCC (Cunha-Neto et al., 2014). Nos pacientes com cardiomiopatia a resposta imune específica do tipo T_H1 é exacerbada e elevada expressão de *CCR5* foi observada nesses pacientes (Gomes et al., 2005). É possível que a expressão elevada de *CCR5* resulte em maior intensidade da inflamação. Assim, o bloqueio parcial de *CCR5* parece ser uma estratégia terapêutica de tratamento eficaz, que visa não prejudicar o controle do crescimento parasitário, mas sim reduzir o processo inflamatório (Marino et al., 2004; Marino et al., 2005).

Novos estudos ainda são necessários para confirmar os achados aqui apresentados e estabelecer o papel de *CCR5* não só na doença de Chagas cardíaca, como também nos diferentes cursos clínicos da doença de Chagas.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil), processos: #2011/08075-4, #2011/19439-7, #2012/20735-2, #2012/05580-2 e Ministério da Educação-CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil).

Conflitos de interesse

Não foram declarados conflitos de interesse.

Referências

Andreani, G., Celentano, A.M., Solana, M.E., Cazorla, S.I., Malchiodi, E.L., Martínez Peralta, L.A., Dolcini, G.L., 2009. Inhibition of HIV-1 replication in human monocyte-derived macrophages by parasite *Trypanosoma cruzi*. PLoS One 4, e8246 1-13.

Ayo, C.M., Dalalio, M.M., Visentainer, J.E., Reis P.G., Sippert, E.Â., Jarduli, L.R., Alves, H.V., Sell, A.M., 2013. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. Biomed Res Int 2013, 284729.

Baggiolini, M., 2001. Chemokines in pathology and medicine. J. Intern. Med. 250, 91-104.

Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B., 1997. Human chemokines: an update. Annu. Rev. Immunol. 15, 675-705.

Barmania, F., Pepper, M.S., 2013. C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection. Appl Transl Genomics 2, 3–16.

Bellini, M.F., Silistino-Souza, R., Varella-Garcia, M., de Azeredo-Oliveira, M.T., Silva, A.E., 2012. Biologic and genetics aspects of chagas disease at endemic areas. J Trop Med 2012, 357948.

Bestetti, R.B., Cardinalli-Neto, A., 2008. Sudden cardiac death in Chagas' heart disease in the contemporary era. Int. J. Cardiol. 131, 9-17.

Bestetti, R.B., Restini, C.B., 2014. Precordial chest pain in patients with chronic Chagas disease. Int. J. Cardiol. 176, 309-314.

Bestetti, T.B., Otaviano, A.P., Cardinali-Neto, A., da Rocha, B.F., Theodoropoulos, T.A.D., Cordeiro, J.A., 2011. Effects of Beta-Blockers on the outcome of patients with Chagas cardiomyopathy with chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* 151, 205-208.

Biolo, A., Ribeiro, A.L., Clausell, N., 2010. Chagas cardiomyopathy—where do we stand after a hundred years?. *Prog Cardiovasc Dis* 52, 300-316.

Brener, Z., 1992. Immune Response and Immunopathology in *Trypanosoma cruzi* Infection Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine, ISBT Brazil'92, São Paulo, p. 31-47.

Buraczynska, M., Zukowski, P., Wacinski, P., Berger-Smyka, B., Dragan, M., Mozul, S., 2012. Chemotactic cytokine receptor 5 gene polymorphism: relevance to microvascular complications in type 2 diabetes. *Cytokine* 58, 213-217.

Calzada, J.E., Nieto, A., Beraún, Y., Martín, J., 2001. Chemokine receptor *CCR5* polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 58, 154-158.

Carod-Artal, F.J., Vargas, A.P., Horan T.A., Nunes, L.G.N., 2005. Chagasic cardiomyopathy is independently associated with ischemic stroke in Chagas' disease. *Stroke* 36, 965-70.

Coura, J.R., 2014. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - Acomprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* doi: 10.1590/0074-0276140362

Cunha-Neto, E., Chevillard, C., 2014. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm.* 2014, 683230.

Cunha-Neto, E., Nogueira, L.G., Teixeira, P.C., Ramasawmy, R., Drigo, S.A., Goldberg, A.C., Fonseca, S.G., Bilate, A.M., Kalil, J., 2009. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(Suppl I), 252-258.

Cutrullis, R.A., Postan, M., Petray, P.B., Corral, R.S., 2009. Timing of expression of inflammatory mediators in skeletal muscles from mice acutely infected with the RA strain of *Trypanosoma cruzi*. *Pathobiology* 76, 170-180.

de Oliveira, C.E., Oda, J.M., Losi Guembarovski, R., de Oliveira, K.B., Ariza, C.B., Neto, J.S., Banin Hirata, B.K., Watanabe, M.A., 2014. CC chemokine receptor 5: the interface of host immunity and cancer. *Dis. Markers* 2014, 126954.

de Souza, S.M., Vieira, P.M., Roatt, B.M., Reis, L.E., da Silva Fonseca, K., Nogueira, N.C., Reis, A.B., Tafuri, W.L., Carneiro, C.M., 2014. Dogs infected with the blood trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* display an increase expression of cytokines and chemokines plus an intense cardiac parasitism during acute infection. *Mol. Immunol.* 58, 92-97.

Espinosa, R., Carrasco, H.A., Belandria, F., Fuenmayor, A.M., Molina, C., Gonzales, R., Martinez, O., 1985. Life expectancy analysis in patients with Chagas disease: prognosis after one decade (1973-1983). *Int. J. Cardiol.* 8, 45-56.

Fernández-Mestre, M.T., Montagnani, S., Layrisse, Z., 2004. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease?. *Hum. Immunol.* 65, 725-728.

Flórez, O., Martín, J., González, C.I., 2012. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Hum. Immunol.* 73, 852-858.

Frade, A.F., Pissetti, C.W., Ianni, B.M., Saba, B., Lin-Wang, H.T., Nogueira, L.G., de Melo Borges, A., Buck, P., Dias, F., Baron, M., Ferreira, L.R., Schmidt, A., Marin-Neto, J.A., Hirata, M., Sampaio, M., Fragata, A., Pereira, A.C., Donadi, E., Kalil, J., Rodrigues, V., Cunha-Neto, E., Chevillard, C., 2013. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infect. Dis.* 13, 587.

Gomes, J.A., Bahia-Oliveira, L.M., Rocha, M.O., Busek, S.C., Teixeira, M.M., Silva, J.S., Correa-Oliveira, R., 2005. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect. Immun.* 73, 7960-7966.

Guedes, P.M., Veloso, V.M., Talvani, A., Diniz, L.F., Caldas, I.S., Do-Valle-Matta, M.A., Santiago-Silva, J., Chiari, E., Galvão, L.M., Silva, J.S., Bahia, M.T., 2010. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138, 106-113.

Hardison, J.L., Wrightsman, R.A., Carpenter, P.M., Kuziel, W.A., Lane, T.E., Manning, J.E., 2006. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 74, 135-143.

Kroll-Palhares, K., Silvério, J.C., Silva, A.A., Michailowsky, V., Marino, A.P., Silva, N.M., Carvalho, C.M., Pinto, L.M., Gazzinelli, R.T., Lannes-Vieira, J., 2008. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8⁺ T lymphocytes and

promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 103, 375-385.

Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., Landau, N.R., 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. Cell 86, 367-377.

Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P., Pena, S.D., 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 1-12.

Machado, F.S., Koyama, N.S., Carregaro, V., Ferreira, B.R., Milanezi, C.M., Teixeira, M.M., Rossi, M.A., Silva, J.S., 2005. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. 191, 627-636.

Machuca, M.A., Suárez, E.U., Echeverría, L.E., Martín, J., González, C.I., 2014. SNP/haplotype Associations of CCR2 and CCR5 Genes with Severity of Chagasic Cardiomyopathy. Hum. Immunol. 75, 1210-1215.

Mamtani, M., Mummidi, S., Ramsuran, V., Pham, M.H., Maldonado, R., Begum, K., Valera, M.S., Sanchez, R., Castiblanco, J., Kulkarni, H., Ndung'u, T., He, W., Anaya, J.M., Ahuja, S.K., 2011. Influence of variations in CCL3L1 and CCR5 on tuberculosis in a northwestern Colombian population. J. Infect. Dis. 203, 1590-1594.

Mariano, F.S., Gutierrez, F.R., Pavanelli, W.R., Milanezi, C.M., Cavassani, K.A., Moreira, A.P., Ferreira, B.R., Cunha, F.Q., Cardoso, C.R., Silva, J.S., 2008. The

involvement of CD4⁺CD25⁺ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 10, 825-833.

Marino, A.P., da Silva, A., dos Santos, P., Pinto, L.M., Gazzinelli, R.T., Teixeira, M.M., Lannes-Vieira, J., 2004. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation* 110, 1443-1449.

Marino, A.P., Silva, A.A., Santos, P.V., Pinto, L.M., Gazinelli, R.T., Teixeira, M.M., Lannes-Vieira, J., 2005. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100(Suppl. 1), 93-96.

Medeiros, G.A., Silvério, J.C., Marino, A.P., Roffê, E., Vieira, V., Kroll-Palhares, K., Carvalho, C.E., Silva, A.A., Teixeira, M.M., Lannes-Vieira, J., 2009. Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage, *Microbes Infect.* 11, 264-273.

Mendes-da-Cruz, D.A., Silva, J.S., Cotta-de-Almeida, V., Savino, W., 2006. Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *Eur. J. Immunol.* 36, 1486-1493.

Nogueira, L.G., Santos, R.H., Ianni, B.M., Fiorelli, A.I., Mairena, E.C., Benvenuti, L.A., Frade, A., Donadi, E., Dias, F., Saba, B., Wang, H.T., Fragata, A., Sampaio, M., Hirata, M.H., Buck, P., Mady, C., Bocchi, E.A., Stolf, N.A., Kalil, J., Cunha-Neto, E., 2012. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas

cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1867. doi: 10.1371/journal.pntd.0001867.

Oliveira, A.P., Bernardo, C.R., Camargo, A.V., Villafanha, D.F., Cavasini, C.E., de Mattos, C.C., de Godoy, M.F., Bestetti, R.B., de Mattos, L.C., 2014. CCR5 chemokine receptor gene variants in chronic Chagas' disease. *Int. J. Cardiol.* 176, 520-522.

Rassi, A.Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-402.

Reis, D.D., Jones, E.M., Tostes, S., Lopes, E.R., Gazzinelli, G., Colley, D.G., McCurley, T.L., 1993. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α ⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 637-644.

Roffê, E., Oliveira, F., Souza, A.L., Pinho, V., Souza, D.G., Souza, P.R., Russo, R.C., Santiago, H.C., Romanha, A.J., Tanowitz, H.B., Valenzuela, J.G., Teixeira, M.M., 2010. Role of CCL3/MIP-1 α and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes Infect.* 12, 669-676.

Rossi, D., Zlotnik, A., 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 217-242.

Sallusto, F., Mackay, C.R., Lanzavecchia, A., 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 593-620.

Sullivan, N.L., Eickhoff, C.S., Zhang, X., Giddings, O.K., Lane, T.E., Hoft, D.F., 2011. Importance of the CCR5-CCL5 axis for mucosal *Trypanosoma cruzi* protection and B cell activation. *J. Immunol.* 187, 1358-1368.

Szpakowska, M., Fievez, V., Arumugan, K., van Nuland, N., Schmit, J.C., Chevigné, A., 2012. Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1366-1380.

Talvani, A., Rocha, M.O., Ribeiro, A.L., Correa-Oliveira, R., Teixeira, M.M., 2004. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. *J. Infect. Dis.* 189, 214-220.

Taylor, J., Bestetti, R.B., 2009. Chagas disease and its toll on the heart. *Eur. Heart J.* 30, 2063-2065.

World Health Organization (2015) Chagas disease (American trypanosomiasis): Fact Sheet No 340.

Tabela 1. Associação dos polimorfismos do gene *CCR5* com doença de Chagas.

População	Genes, alelos, genótipos ou haplótipos	Polimorfismo	Tipo de associação	Forma clínica	Referência
Brasil	<i>CCR5 C/A</i>	rs3176763	Suscetibilidade	CCC	Frade et al., 2013
	<i>CCR5 A/T</i>	rs11575815	Suscetibilidade	CCC	
	<i>CCR5 C/C</i>	rs3176763	Proteção	CCC	
Brasil	<i>CCR5 C</i>	rs1799988	Suscetibilidade	gravidade da CCC	Nogueira et al., 2012
	<i>CCR5 C/C</i>	rs1799988	Suscetibilidade	gravidade da CCC	
Colômbia	<i>CCR5 -2733G</i>	rs2856758	Proteção	CCC	Flórez et al., 2012
	<i>CCR5 -2554 T</i>	rs2734648	Proteção	Gravidade da CCC	
	<i>CCR5 59029 G / HHA</i>	rs1799987	Suscetibilidade	CCC	
	<i>CCR5Δ32</i>	rs333	Não associado	CCC	
Colômbia	<i>CCR5 -1835 T / HHF*2</i>	rs1800024	Suscetibilidade	gravidade da CCC	Machuca et al., 2014
	<i>CCR5 -2554 T / HHC</i>	rs2734648	Proteção	CCC	
	<i>CCR5 -2086 G / HHC</i>	rs1800023	Proteção	CCC	
Venezuela	<i>CCR5 59029 G/G</i>	rs1799987	Proteção	CCC	Fernández-Mestre et al., 2004
	<i>CCR5/CCR5Δ32</i>	rs333	Proteção sugerida ^a	CCC	
Peru	<i>CCR5Δ32</i>	rs333	Não associado	infecção/CCC	Calzada et al., 2001
	<i>CCR5 59029 A/G</i>	rs1799987	Proteção	CCC	
Brasil	<i>CCR5Δ32</i>	rs333	Não associado	gravidade da CCC	Oliveira et al., 2014
	<i>CCR5 59029 A/G</i>	rs1799987	Não associado	gravidade da CCC	

CCC: Cardiopatia Chagásica Crônica; ^aProteção sugerida: os autores sugerem associação, porém as diferenças não foram estatisticamente significantes.

Concentrações plasmáticas de CCL3 e CCL4 nas formas clínicas digestiva e cardíaca da doença de Chagas crônica

CCL3 e CCL4 na doença de Chagas crônica

Amanda Priscila de Oliveira¹, Christiane Maria Ayo¹, Kallyne Kioko Oliveira Mimura², Sonia Maria Oliani², Cássia Rubia Bernardo¹, Ana Vitória da Silveira Camargo¹, Luiz Sérgio Ronchi³, Aldenis Albaneze Borim³, João Gomes Netinho³, Cinara de Cássia Brandão de Mattos¹, Daniel Fernando Villafanha⁴, Lilian Castiglioni⁵, Reinaldo Bulgarelli Bestetti⁴, Carlos Eugênio Cavasini⁶, Luiz Carlos de Mattos¹

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

²Laboratório de Imunomorfologia, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

³Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁴Departamento de Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁵Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

⁶Centro de Investigação de Microrganismos, Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Autor correspondente. Endereço para correspondência: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos - E-mail: luiz.carlos@famerp.br - Laboratório de Imunogenética - Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 - São José do Rio Preto, SP – Brazil - Fone: 55 17 3201-5857 / Fax: 55 17 3229-1777

Potenciais conflitos de interesse. Todos os autores: Não há conflito.

Apoio financeiro. Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [números dos processos #2011/08075-4, #2011/19439-7, #2012/20735-2, #2012/05580-2 e #2013/06580-9], Ministério da Educação - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil, bolsa de doutorado e Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (BAP-FAMERP).

Resumo

Introdução: A resposta imune desempenha papel relevante na determinação do curso da infecção por *Trypanosoma cruzi*. O objetivo desse estudo foi investigar os níveis plasmáticos das quimiocinas CCL3 e CCL4 nos pacientes com doença de Chagas crônica digestiva e cardíaca, e nestes, com e sem disfunção sistólica ventricular esquerda.

Métodos: Foram selecionadas amostras de plasma de 75 pacientes. O teste de ELISA foi realizado para confirmar a infecção por *T. cruzi*. Os níveis plasmáticos das quimiocinas foram medidos usando ensaio multiplex Milliplex[®] MAP (Millipore). Para comparação dos resultados foram realizados o Teste T de Student ou Teste de Mann-Whitney.

Resultados: Não houve diferenças nas concentrações de CCL3 e CCL4 entre os pacientes com doença digestiva e cardíaca, como também entre os pacientes com função sistólica ventricular esquerda normal e com disfunção. Maiores níveis plasmáticos de CCL3 e CCL4 foram verificados em pacientes com disfunção sistólica ventricular esquerda, comparados com aqueles com a forma digestiva.

Conclusões: CCL3 e CCL4 podem não estar envolvidas na suscetibilidade diferencial as formas digestiva e cardíaca da doença de Chagas crônica, além de não influenciar no desenvolvimento da disfunção cardíaca. Nossos dados sugerem maior atividade inflamatória dependente de CCL3 e CCL4 nos pacientes com disfunção cardíaca, em relação aos pacientes com a forma digestiva.

Palavras-chave: doença de Chagas; cardiopatia chagásica crônica; quimiocina CCL3; quimiocina CCL4.

INTRODUÇÃO

A apresentação clínica da doença de Chagas é variável e inclui as formas cardíaca, digestiva e mista. A Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) é a forma clínica mais frequente dessa enfermidade, acometendo cerca de 30% dos pacientes infectados pelo *Trypanosoma cruzi* [1,2]. CCC é a mais grave manifestação clínica da doença de Chagas [3]. Esta forma da doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, que varia de poucos sintomas, geralmente relacionados a distúrbios do ritmo e da condução, à cardiomiopatia dilatada. As principais causas de morte em pacientes com essa forma clínica são a insuficiência cardíaca, eventos tromboembólicos, arritmias graves e morte súbita [4-6].

A forma digestiva da doença afeta aproximadamente 10% dos indivíduos infectados, e é representada clinicamente por megaesôfago e megacólon, decorrente da dilatação do esôfago e/ou cólon, respectivamente [1,2]. Fatores importantes na patogênese da forma digestiva incluem anormalidades do sistema nervoso entérico autônomo e o infiltrado inflamatório atua como efetor na destruição do plexo mioentérico, resultando nos megas [7].

A variabilidade genética tanto do hospedeiro quanto do parasito e fatores ambientais atuam no variável curso clínico da doença, porém nem todos os fatores foram esclarecidos [7-9]. Embora a resposta imune seja essencial no controle do crescimento parasitário, lesões no coração e no trato digestivo podem ser decorrentes de desequilíbrios imunológicos, sendo importante destacar o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento das diferentes manifestações clínicas da doença, bem como o papel das citocinas no curso dessa enfermidade [1].

O envolvimento do receptor para quimiocinas CCR5 foi elucidado na infecção por *T. cruzi* [10-15]. Um estudo demonstrou que a interação macrófago-*T. cruzi* resulta na expressão das quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5, as quais são ligantes do receptor CCR5 [16]. No miocárdio de camundongos infectados com *T. cruzi* foram detectadas a presença de CCL3, CCL4 e CCL5 [17]. O objetivo desse estudo foi investigar as concentrações plasmáticas das quimiocinas CCL3 e CCL4 nos pacientes com doença de Chagas crônica digestiva e cardíaca, além de investigar estes mediadores inflamatórios entre os pacientes com CCC com e sem disfunção sistólica ventricular esquerda (DSVE).

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos e seleção da casuística

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (Parecer 009/2011). Os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, após receberem todas as informações sobre a pesquisa. Foram selecionados 38 pacientes consecutivos, de ambos os sexos atendidos no Ambulatório de Cardiomiopatia e 37 pacientes consecutivos atendidos no ambulatório de cirurgia geral, ambos do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina (HB-FUNFARME), São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil.

Diagnóstico clínico e sorológico

O ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) foi realizado para confirmar a infecção por *T. cruzi*, de acordo com as instruções do fabricante (bioMérieux Brasil S.A.).

Os pacientes com sorologia reagente foram submetidos à avaliação clínica, eletrocardiograma, ecocardiograma e raios-X de tórax, sendo considerados com CCC aqueles que apresentaram alterações características no eletrocardiograma e/ou no estudo ecocardiográfico [18]. A anormalidade ecocardiográfica indicativa de DSVE foi à fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) <60% obtida pelo método de Teichholz!. Nos casos em que não houve condição técnica de diferenciação desta anormalidade, utilizou-se o critério FEVE <50% obtido na Ventriculografia com Radionuclídeos.

Os pacientes com CCC foram divididos em 2 grupos de acordo com a FEVE, sendo classificados como: com função sistólica ventricular esquerda normal aqueles diagnosticados com FEVE $\geq 60\%$; e com DSVE aqueles com FEVE <60%. Nos pacientes em que a FEVE foi obtida por Ventriculografia com Radionuclídeos, FEVE $\geq 50\%$ indicou pacientes com função sistólica ventricular esquerda normal; FEVE <50% indicou DSVE.

Os pacientes que apresentaram sintomas da doença digestiva foram submetidos aos seguintes exames para confirmação do diagnóstico clínico: Manometria Anorretal, RX de Enema Opaco, Manometria Esofágica e RX de Seriografia. Foram excluídos do estudo aqueles que apresentaram a forma mista da doença (formas cardíaca e digestiva).

Quantificação das quimiocinas CCL3 e CCL4

Os níveis plasmáticos das quimiocinas CCL3 e CCL4 foram quantificados usando ensaio multiplex MILLIPLEX[®] MAP human cytokine/chemokine panel (# HSTCMAG-28SK; Millipore Corporation, USA) e MAGPIX[®] Multiplexing Instrument (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações das

quimiocinas (pg/mL) foram determinadas por MAGPIX Xponent software (Millipore Corporation, Billerica, MA,USA).

Análise Estatística

Para caracterização da casuística, as variáveis quantitativas foram descritas por média, mediana e desvio padrão. Para comparação das variáveis contínuas foi utilizado o teste t não pareado.

Para a análise estatística inferencial das variáveis quantitativas foram utilizados testes estatísticos paramétricos e/ou não-paramétricos, dependendo do comportamento das mesmas em relação à normalidade, a qual foi verificada aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram aplicados testes para comparação de médias duas a duas (Teste T de Student, para dados paramétricos) ou para comparação de medianas (Teste de Mann-Whitney, para dados não paramétricos).

Para todos os testes, consideramos um intervalo de confiança (IC) de 95,0% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor p foi $\leq 0,05$. Os dados coletados foram analisados usando-se o programa GraphPad InStat 3.06 e Prisma 6.01.

RESULTADOS

Caracterização da casuística

Dos 75 pacientes incluídos no estudo, 41 (54,7%) eram do sexo feminino e 34 (45,3%) do sexo masculino. A média de idade geral foi $66,0 \pm 11,5$ (mediana 67,0; mínimo de 43; máximo de 93). Dos pacientes com doença de Chagas digestiva, 21 (56,8%) eram do sexo feminino e 16 (43,2%) do sexo masculino, com média de idade de $68,7 \pm 12,0$ (mediana 72,0; mínimo de 43; máximo de 93).

Dentre os pacientes com CCC, 20 (52,6%) eram do sexo feminino e 18 (47,4%) do sexo masculino. A média de idade foi igual a $63,5 \pm 10,5$ (mediana 63,0; mínimo de 46; máximo de 87). A diferença entre as médias de idade dos pacientes com CCC ($63,5 \pm 10,5$) e os pacientes com doença de Chagas digestiva ($68,7 \pm 12,0$) foi estatisticamente significativa ($p= 0,05$).

Em relação à função sistólica ventricular esquerda, entre os pacientes com CCC, 13 (34,2%) apresentaram função sistólica ventricular esquerda normal e 25 (65,8%) apresentaram DSVE. A tabela 1 mostra as frequências dos gêneros feminino e masculino entre os grupos de pacientes com CCC.

Quantificação da quimiocina CCL3

Os níveis de CCL3 entre os pacientes com doença de Chagas digestiva variaram de 0,0 pg/mL à 92,90 pg/mL, com média de $12,5 \pm 19,2$ e mediana de 8,21. Nos pacientes com CCC as concentrações estavam entre 0,02 pg/mL e 71,64 pg/mL, com média de $12,8 \pm 11,8$ e mediana de 11,73. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações de CCL3 nos grupos de pacientes com doença digestiva e CCC ($p= 0,08$) (figura 1A).

As concentrações de CCL3 entre os pacientes com função sistólica ventricular esquerda normal variaram de 0,05 pg/mL à 19,96 pg/mL, com média de $9,3 \pm 5,7$ e mediana de 8,95; enquanto nos pacientes com DSVE as concentrações variaram entre 0,02 pg/mL e 71,64 pg/mL, com média de $14,6 \pm 13,7$ e mediana de 15,06. As diferenças entre estes dois grupos não foram estatisticamente significantes ($p= 0,19$) (figura 2A).

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes comparando o grupo de pacientes com doença digestiva com aqueles que apresentaram CCC com DSVE ($p=0,05$) (figura 3A).

Quantificação da quimiocina CCL4

Entre os pacientes com doença digestiva os níveis de CCL4 variaram de 0,37 pg/mL à 7,37 pg/mL, com média de $1,9 \pm 1,6$ e mediana de 1,39. Os níveis de CCL4 entre os pacientes com CCC foram de 0,56 pg/mL à 5,56 pg/mL, com média de $2,1 \pm 1,1$ e mediana de 1,88. As diferenças entre as concentrações de CCL4 e os pacientes com CCC e doença digestiva não foram estatisticamente significantes ($p=0,06$) (figura 1B).

Entre os pacientes com CCC, as concentrações de CCL4 entre os pacientes com função sistólica ventricular esquerda normal foram de 0,62 pg/mL à 3,76 pg/mL, com média de $1,8 \pm 1,0$ e mediana de 1,62; enquanto nos pacientes com DSVE as concentrações estavam entre 0,56 pg/mL e 5,56 pg/mL, com média de $2,2 \pm 1,1$ e mediana de 2,01. As diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes ($p=0,29$) (figura 2B).

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes com doença digestiva e aqueles que apresentaram CCC com DSVE ($p=0,03$) (figura 3B).

DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi investigar se diferenças nos níveis plasmáticos das quimiocinas CCL3 e CCL4 estão envolvidas na suscetibilidade diferencial às formas

cardíaca e digestiva da doença de Chagas crônica. Além disso, investigar estas quimiocinas entre os pacientes com CCC com e sem DSVE. Embora a resposta imune seja essencial no controle do crescimento do *T. cruzi*, ela também desempenha papel no desenvolvimento das diferentes manifestações clínicas da doença [1]. Há evidências do envolvimento das citocinas e quimiocinas na geração do infiltrado inflamatório e no dano tecidual [7]. As quimiocinas CCL3 e CCL4 estão envolvidas na infecção pelo *T. cruzi* [16,17], sendo importante avaliar esses mediadores inflamatórios nas formas evolutivas da doença de Chagas, a fim de verificar se elas estão influenciando no curso dessa enfermidade.

A média de idade da casuística analisada neste estudo situou-se em 66 anos e houve diferença entre os grupos de pacientes com doença de Chagas digestiva e CCC. A média de idade dos pacientes com doença digestiva foi maior do que aqueles com CCC. A CCC geralmente acomete indivíduos na faixa etária entre 30 e 60 anos [19]. A média de idade e a mediana dos pacientes com doença digestiva deste estudo foram maiores do que aquelas encontradas em outros estudos [20,21].

As frequências dos gêneros feminino e masculino não diferiram entre os grupos de pacientes com CCC. No entanto, na literatura há predominância do sexo masculino entre os pacientes com CCC. Além disso, foram observadas associações do sexo masculino com aumento da mortalidade. No entanto, esta observação permanece controversa [22,23].

As quimiocinas controlam o tráfego de linfócitos [24]. CCL3 é quimioatraente para monócitos, macrófagos, células T e células NK. CCL4 apresenta quimiotaxia para monócitos, células T e células NK [25]. Já foi demonstrada a atração preferencial de células TCD4⁺ por CCL4 e de células TCD8⁺ predominantemente pela quimiocina

CCL3 [26]. Macrófagos, linfócitos B, T e uma minoria de células NK são componentes do infiltrado inflamatório na CCC, com predomínio das células T CD8⁺ [27]. Na doença de Chagas digestiva, células TCD4⁺, macrófagos, linfócitos B e NK são as principais células infiltradas [9].

Durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10 induzem a migração de células T específicas e outros leucócitos para os locais de inflamação [27]. O envolvimento de CCL3, CCL4 e CCL5 na atividade tripanocida exercida pelos macrófagos foi relatado [28]. A interação macrófago-*T. cruzi* resulta na expressão de CCL3, CCL4 e CCL5, as quais exercem papel na produção de NO pelos macrófagos humanos, na infecção por *T. cruzi* [16,29].

No presente estudo, as diferenças nas concentrações de CCL3 e CCL4 entre os grupos de pacientes com doença digestiva e CCC não foram estatisticamente significantes. A patogênese da doença de Chagas envolve a ocorrência de reação inflamatória e a resposta imune desempenha papel relevante na determinação do curso da infecção e das distintas formas clínicas da doença [9]. Nesse sentido, CCL3 e CCL4 parecem não exercer papel relevante na diversidade da resposta imune do hospedeiro nas formas clínicas da doença. Assim, estas quimiocinas podem não estar envolvidas na suscetibilidade diferencial as formas digestiva e cardíaca da doença de Chagas crônica.

Pelo nosso conhecimento, estas quimiocinas não foram investigadas na doença de Chagas digestiva. A expressão de RNAm para CCL3 e CCL4 foram detectadas tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da infecção por *T. cruzi* em camundongos [30]. No miocárdio de camundongos infectados com *T. cruzi* foram detectadas a presença de CCL3, CCL4 e CCL5, as quais foram associadas com leucócitos infiltrados no coração

[17]. Marino et al. [31] também detectaram expressão elevada de RNAm para CCL3, CCL4 e CCL5 no coração de camundongos infectados, comparados com aqueles sem a infecção. A expressão elevada de RNAm para CCL4 e CCL5 foi observada em cães com a forma cardíaca da doença de Chagas, comparados com aqueles que apresentaram a forma indeterminada [32]. Análise imunohistoquímica revelou menor expressão de CCL3 nas células da língua de pacientes com doença de Chagas crônica, comparados com indivíduos não infectados [33].

Neste estudo, as diferenças nas concentrações de CCL3 e CCL4 entre os pacientes com CCC com função sistólica ventricular esquerda normal e os pacientes com DSVE não foram estatisticamente significantes. Os resultados do estudo de Talvani et al. [34] são consistentes com os nossos resultados. Estes autores não encontraram associação entre as concentrações plasmáticas de CCL3 e a gravidade da disfunção cardíaca, em pacientes com CCC. Embora em outras doenças cardíacas CCL3 e CCL4 tenham sido associadas com o grau de função cardíaca [35,36], nos pacientes com CCC elas parecem não influenciar no desenvolvimento da disfunção cardíaca.

No presente estudo, os níveis plasmáticos de CCL3 e CCL4 foram maiores nos pacientes com CCC com DSVE em comparação com os pacientes com a forma digestiva da doença. Tanto na forma digestiva quanto na forma cardíaca da doença de Chagas crônica o infiltrado inflamatório é responsável por lesões teciduais. No entanto, há diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos. A principal característica da doença digestiva é a denervação, uma vez que o desenvolvimento de megaesôfago está associado com redução de aproximadamente 85% do número de neurônios, enquanto no megacólon a redução destas células é cerca de 50%. A resposta imune pode estar envolvida neste processo de denervação [9].

Na CCC a miocardite é uma característica importante, a qual já foi correlacionada com a gravidade clínica da doença. Intensa miocardite pode ser observada nos pacientes com CCC grave [37]. Além disso, as quimiocinas CCL3 e CCL5 são ligantes do receptor CCR5, o qual já foi associado com a patogênese da CCC [15,32,38]. Portanto, nossos dados sugerem que ocorre maior atividade inflamatória dependente de CCL3 e CCL4 nos pacientes com CCC que apresentam DSVE, em relação aos pacientes com a forma digestiva da doença.

Este foi o primeiro estudo que investigou as quimiocinas CCL3 e CCL4 na forma digestiva da doença de Chagas crônica. Os resultados do nosso trabalho devem ser considerados preliminares principalmente devido ao reduzido número amostral. É desejável que novos estudos sejam realizados em outras populações para confirmar os dados aqui relatados.

De acordo com os resultados do presente estudo, as concentrações plasmáticas de CCL3 e CCL4 parecem não estar envolvidas na suscetibilidade diferencial as formas digestiva e cardíaca da doença de Chagas crônica. Estas quimiocinas parecem não influenciar o desenvolvimento da DSVE, e nestes pacientes, maior atividade inflamatória dependente de CCL3 e CCL4 pode ocorrer, em relação à forma digestiva da doença.

Agradecimentos

Agradecemos a todos os pacientes que concordaram em participar do estudo. Endereço atual do Dr. Reinaldo Bulgarelli Bestetti: Universidade de Ribeirão Preto, Departamento de Medicina. Av. Costábile Romano, 2201, Centro, 14096-900 - Ribeirão Preto, SP – Brazil.

Referências

- [1] Ayo CM, Dalalio MM, Visentainer JE et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *Biomed Res Int* 2013; 284729.
- [2] Bestetti RB, Restini CB. Precordial chest pain in patients with chronic Chagas disease. *Int J Cardiol* 2014; 176:309-14.
- [3] Brener Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82:205-13.
- [4] Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infect Dis* 2001; 1:92-100.
- [5] Rassi AJr, Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 2000; 23:883-9.
- [6] Bestetti RB, Cardinalli-Neto A. Sudden cardiac death in Chagas' heart disease in the contemporary era. *Int J Cardiol* 2008; 131:9-17.
- [7] Bellini MF, Silistino-Souza R, Varella-Garcia M, de Azeredo-Oliveira MT, Silva AE. Biologic and genetics aspects of chagas disease at endemic areas. *J Trop Med* 2012; 2012:357948.
- [8] Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:1-12.
- [9] Dutra WO, Menezes CA, Villani FN et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses inhuman Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; Suppl1: 208-18.

-
- [10] Machuca MA, Suárez EU, Echeverría LE, Martín J, González CI. SNP/haplotype Associations of CCR2 and CCR5 Genes with Severity of Chagasic Cardiomyopathy. *Hum Immunol* 2014;75:1210-5.
- [11] Frade AF, Pissetti CW, Ianni BM et al. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infect Dis* 2013; 13:587.
- [12] Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM et al. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1867. doi: 10.1371/journal.pntd.0001867.
- [13] Flórez O, Martín J, González CI. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Hum Immunol* 2012; 73:852-8.
- [14] Hardison JL, Wrightsman RA, Carpenter PM, Kuziel WA, Lane TE, Manning JE. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 2006; 74:135-43.
- [15] Marino AP, Silva AA, Santos PV et al. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; Suppl 1:93-96.
- [16] Aliberti JC, Machado FS, Souto JT et al. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1999; 67:4819-26.

- [17] Machado FS, Koyama NS, Carregaro V 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.
- [18] Bestetti RB, Otaviano AP, Cardinalli-Neto A, da Rocha BF, Theodoropoulos TA, Cordeiro JA. Effects of B-Blockers on outcome of patients with Chagas' cardiomyopathy with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2011; 151:205-8.
- [19] 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.
- [20] Kamiji MM, de Oliveira RB. Features of Chagas' disease patients with emphasis on digestive form, in a tertiary hospital of Ribeirão Preto,SP. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38:305-9.
- [21] Souza DH, Vaz Mda G, Fonseca CR, Luquetti A, Rezende Filho J, Oliveira EC. Current epidemiological profile of Chagasic megaesophagus in Central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46:316-21.
- [22] Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. 2010. Chagas cardiomyopathy—where do we stand after a hundred years? *Prog Cardiovasc Dis* 52:300-16.
- [23] Nunes MC, Carmo AA, Rocha MO, Ribeiro AL. 2012. Mortality prediction in Chagas heart disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 10:1173-84.
- [24] Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2:123-8.
- [25] Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:455-81.

- [26] Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science* 1993; 260:355-8.
- [27] Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC 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(Suppl I):252-8.
- [28] Lima MF, Zhang Y, Villalta F. Beta-chemokines that inhibit HIV-1 infection of human macrophages stimulate uptake and promote destruction of *Trypanosoma cruzi* by human macrophages. *Cell Mol Biol* 1997; 43:1067-76.
- [29] Villalta F, Zhang Y, Bibb KE, Kappes JC, Lima MF. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun* 1998; 66:4690-5.
- [30] dos Santos PV, Roffê E, Santiago HC et al. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect* 2001; 3:971-84.
- [31] Marino AP, da Silva A, dos Santos P et al. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation* 2004; 110:1443-9.

-
- [32] Guedes PM, Veloso VM, Talvani A 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.
- [33] de Lima Pereira SA, Severino VO, Kohl NL et al. Expression of cytokines and chemokines and microvasculature alterations of the tongue from patients with chronic Chagas' disease. *Parasitol Res* 2009; 105:1031-9.
- [34] 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.
- [35] Aukrust P, Ueland T, Müller F et al. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998 ;97:1136-43.
- [36] Damås JK, Gullestad L, Aass H et al. Enhanced gene expression of chemokines and their corresponding receptors in mononuclear blood cells in chronic heart failure--modulatory effect of intravenous immunoglobulin. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:187-93.
- [37] Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:683230.
- [38] Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun* 2005; 73:7960-66.

Tabela 1. Frequências dos gêneros feminino e masculino entre os grupos de pacientes com CCC com função sistólica ventricular esquerda normal e com disfunção sistólica ventricular esquerda.

Gêneros	Normal		Com DSVE ^a		χ^2	GL ^b	p ^c
	no.	%	no.	%			
Feminino	8	61,5	12	48,0	0,629	1	0,428
Masculino	5	38,5	13	52,0			
Total	13	100	25	100			

^a DSVE: disfunção sistólica ventricular esquerda ^b GL: Graus de liberdade; ^c Calculado por χ^2 .

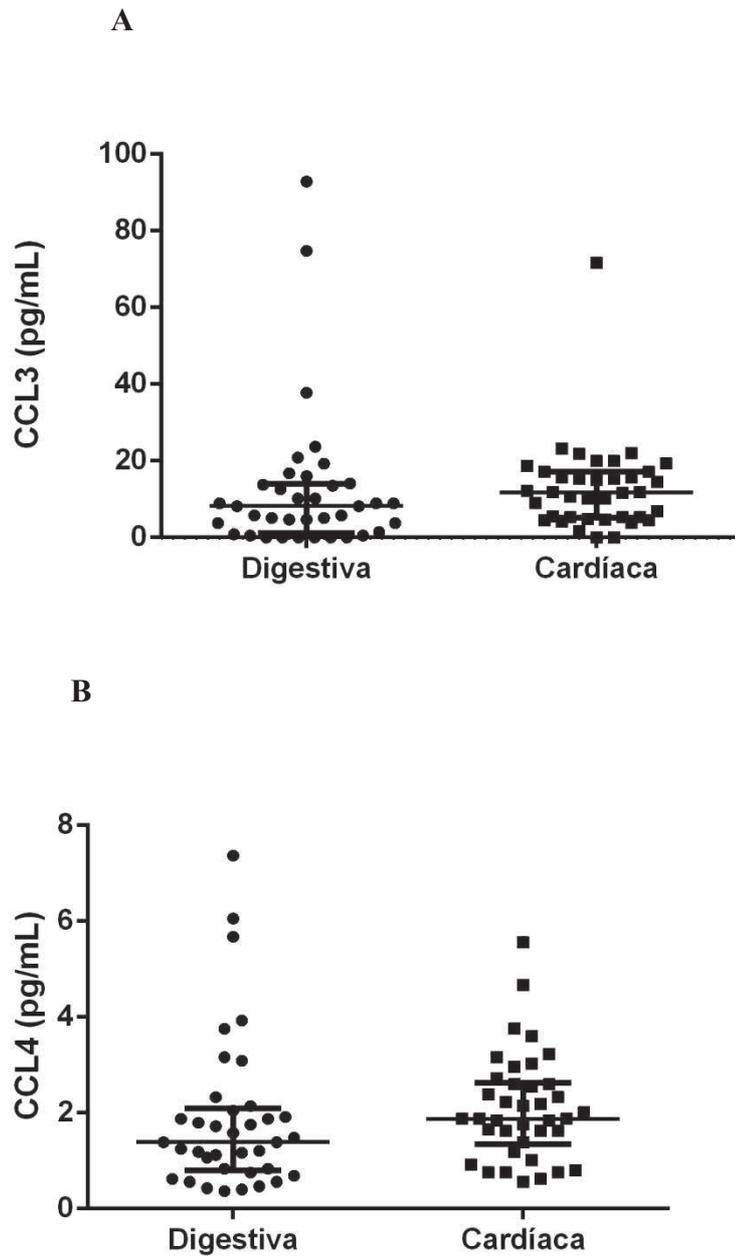


Figura 1. Concentrações plasmáticas de CCL3 (A) e CCL4 (B) obtidas de pacientes com a forma digestiva e cardíaca (CCC) da doença de Chagas crônica. As linhas representam valores da mediana com variação interquartil.

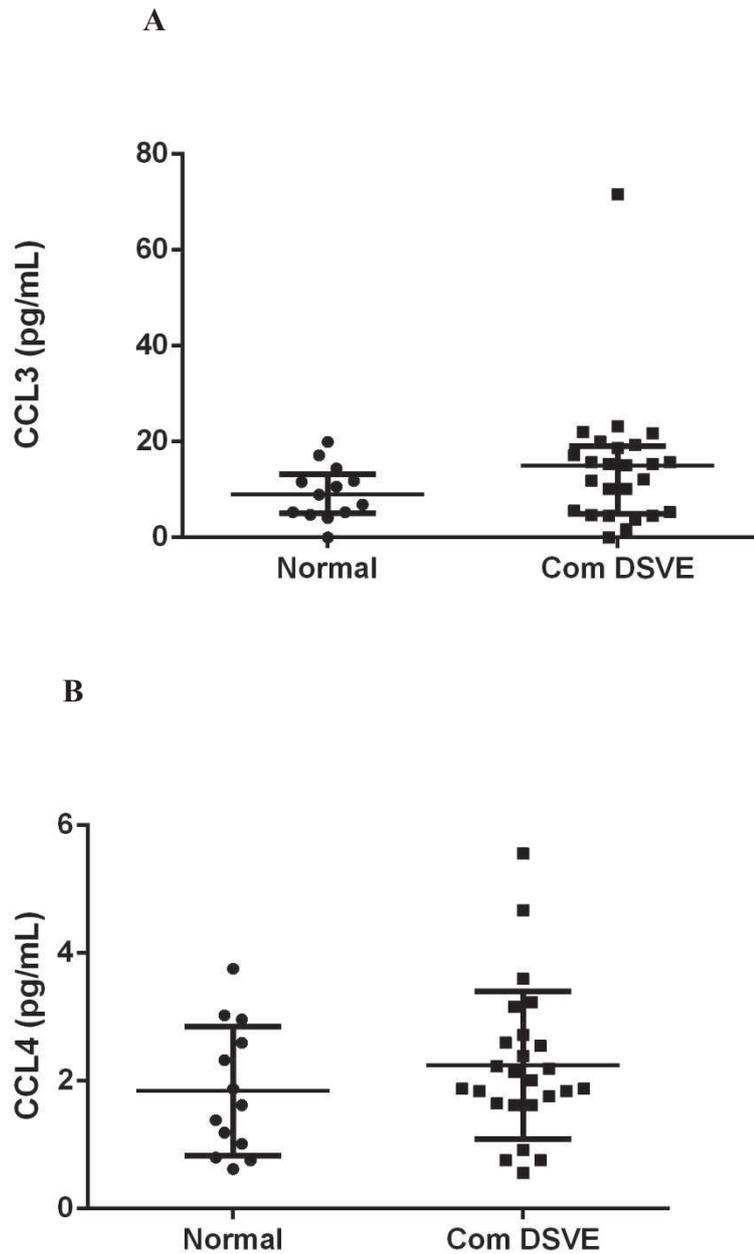


Figura 2. Concentrações plasmáticas de CCL3 (A) e de CCL4 (B) obtidas de pacientes com a forma cardíaca (CCC), com função sistólica ventricular esquerda normal e com DSVE (disfunção sistólica ventricular esquerda). Em (A) as linhas representam valores da mediana com variação interquartil. Em (B) as linhas representam valores da média com desvio padrão.

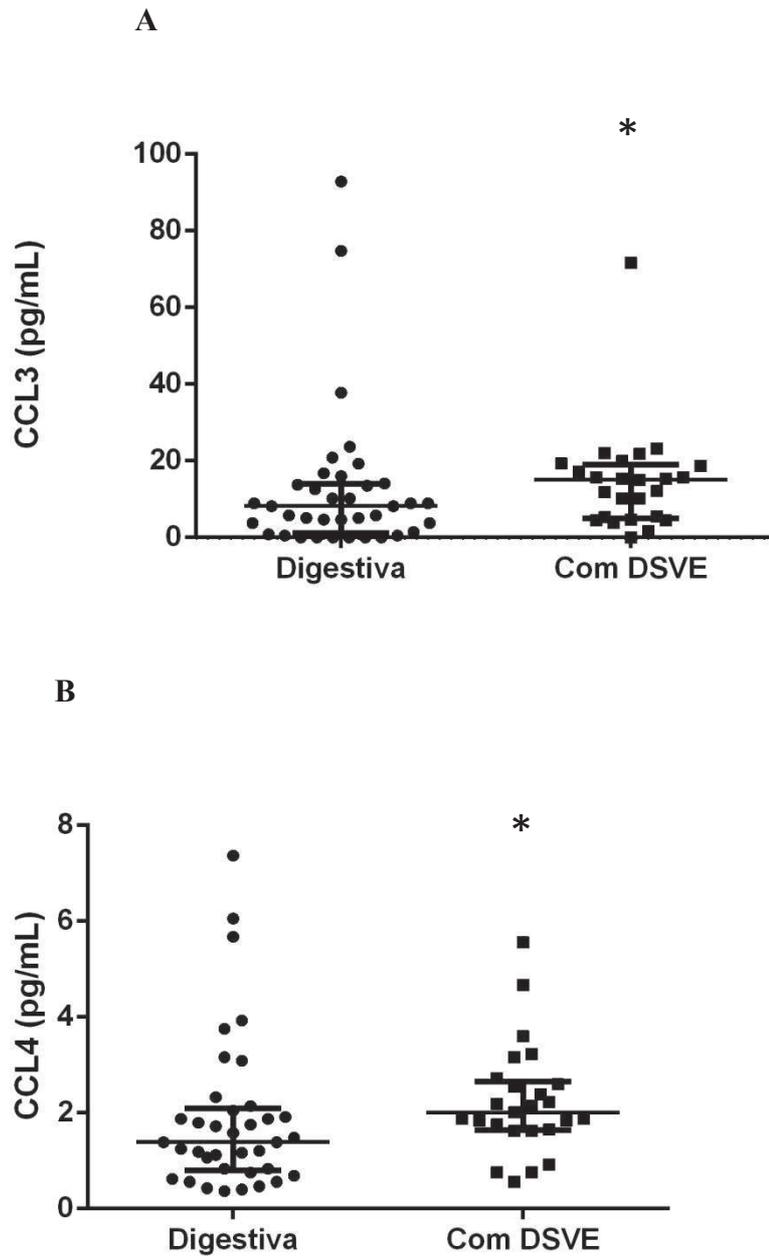


Figura 3. Concentrações plasmáticas de CCL3 (A) e de CCL4 (B) obtidas de pacientes com a forma digestiva da doença de Chagas e cardíaca (CCC) com DSVE (disfunção sistólica ventricular esquerda). As linhas representam valores da mediana com variação interquartil. Em (A) $*p= 0,05$; em (B) $*p= 0,03$.

3. CONCLUSÕES

3. CONCLUSÕES

1. Os polimorfismos *CCR5*Δ32 (rs333) e *CCR5* 59029 A/G (rs1799987) não estão associados à disfunção sistólica ventricular esquerda nos pacientes com doença de Chagas crônica cardíaca.

2. O polimorfismo *CCR5*Δ32 parece não influenciar nas diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas. Já o polimorfismo *CCR5* 59029 A/G está envolvido na suscetibilidade diferencial às formas crônicas digestiva e cardíaca da doença de Chagas, na população estudada. O genótipo *AA* está associado com a doença de Chagas crônica cardíaca e o genótipo *AG* está associado com a forma digestiva da doença de Chagas crônica.

3. As concentrações plasmáticas de CCL3 e CCL4 parecem não estar envolvidas na suscetibilidade diferencial às formas digestiva e cardíaca da doença de Chagas crônica.

4. As concentrações plasmáticas de CCL3 e CCL4 parecem não influenciar o desenvolvimento da disfunção sistólica ventricular esquerda, e nestes pacientes, maior atividade inflamatória dependente de CCL3 e CCL4 pode ocorrer, em relação à forma digestiva da doença.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ayo CM, Dalalio MM, Visentainer JE, Reis PG, Sippert EÂ, Jarduli LR, et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. *Biomed Res Int* 2013;284729.
2. World Health Organization – WHO [homepage na Internet]. Geneva: WHO; 2015 [acesso em 2015 Jul 6]. Chagas disease (American trypanosomiasis); [aproximadamente 4 telas]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
3. Pan American Health Organization – PAHO [homepage na Internet]. 2015 [acesso em 2015 Jul 6]. Chagas Disease; [aproximadamente 1 tela]. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9467:chagas-disease&Itemid=40721&lang=fr
4. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375:1388-402.
5. Coura JR, Vinãs PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010;465:S6-7.
6. Bestetti RB, Restini CB. Precordial chest pain in patients with chronic Chagas disease. *Int J Cardiol* 2014;176:309-14.
7. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - Acomprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110:277-82.

8. Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasit Vectors* 2014;7:317.
9. 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.
10. Bestetti RB, Martins CA, Cardinalli-Neto A. Justice where justice is due: A posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879-1934), the discoverer of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Int J Cardiol* 2009;134:9-16.
11. Clayton J. Chagas disease 101. *Nature* 2010;465:S4-5.
12. Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am* 2012;26:275-91.
13. Bellini MF, Silistino-Souza R, Varella-Garcia M, de Azeredo-Oliveira MT, Silva AE. Biologic and genetics aspects of chagas disease at endemic areas. *J Trop Med* 2012; 357948.
14. 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.
15. Centers for Disease Control and Prevention – CDC [homepage na Internet]. Atlanta: CDC; 2015 [acesso em 2015 Jul 7]. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease); [aproximadamente 2 telas]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

16. Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas cardiomyopathy--where do we stand after a hundred years?. *Prog Cardiovasc Dis.* 2010;52:300-16.
17. Bestetti RB, Otaviano AP, Cardinalli-Neto A, da Rocha BF, Theodoropoulos TA, Cordeiro JA. Effects of B-Blockers on outcome of patients with Chagas' cardiomyopathy with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2011; 151:205-8.
18. Bestetti RB, Cardinalli-Neto A. Sudden cardiac death in Chagas' heart disease in the contemporary era. *Int J Cardiol* 2008; 131:9-17.
19. Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LH, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2010;10:337.
20. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* [periódico na Internet]. 2005 [acesso em 2015 Jul 7];38(Suppl 3):[aproximadamente 29 p.]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/ZOO/chagas05_consenso_svs.pdf
21. Keenan M, Chaplin JH. A new era for chagas disease drug discovery? *Prog Med Chem* 2015;54:185-230.
22. Álvarez JM, Fonseca R, Borges da Silva H, Marinho CR, Bortoluci KR, Sardinha LR et al. Chagas disease: still many unsolved issues. *Mediators Inflamm* 2014;2014:912965.
23. 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.

24. Talvani A, Teixeira MM. Inflammation and Chagas disease some mechanisms and relevance. *Adv Parasitol* 2011;76:171-94.
25. Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:103-10.
26. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e29.
27. Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis Dd et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; Suppl1:208-18.
28. Bonney KM, Engman DM. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease: Looking Back, Looking Ahead. *Am J Pathol* 2015;185:1537-47.
29. Machado FS, Tyler KM, Brant F, Esper L, Teixeira MM, Tanowitz HB. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013; 4:1743-58.
30. 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.
31. Sousa GR, Gomes JA, Fares RC, Damásio MP, Chaves AT, Ferreira KS et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in chagas disease. *PLoS One* 2014;9:e87082.

32. de Araújo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR, Assis Silva Gomes J, Sathler-Avelar R et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e992.
33. Ribeiro BM, Crema E, Rodrigues V Jr. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. *Hum Immunol* 2008;69:484-9.
34. Pissetti CW, Correia D, Braga T, Faria GE, Oliveira RF, Ribeiro BM et. al. Association between the plasma levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42:425-30.
35. Crema E, Monteiro Ide O, Gomes MG, Silva AA, Rodrigues Júnior V. Evaluation of cytokines (MIG, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-5, and IL-10) during the different evolutive phases of chagasic esophagopathy. *Clin Immunol* 2006;119:213-8.
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. Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:106-15.
38. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286:2098-102.
39. Bachelierie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ et al. *International Union of Basic and Clinical Pharmacology.*

[corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2013;66:1-79.

40. Szpakowska M, Fievez V, Arumugan K, van Nuland N, Schmit JC, Chevigné A. Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors. *Biochem Pharmacol* 2012; 84:1366-1380.

41. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-77.

42. Mummidi S, Ahuja SS, McDaniel BL, Ahuja SK. The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons. *J Biol Chem* 1997;272:30662-71.

43. Barmania F, Pepper MS. C-C chemokine receptor type five (CCR5): An emerging target for the control of HIV infection. *Applied & Translational Genomics* 2013;2:3-16.

44. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-6.

45. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667-73.

46. Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med* 1997; 185:1681-91.
47. McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. *Lancet* 1998; 352:866-70.
48. Shieh B, Liao YE, Hsieh PS, Yan YP, Wang ST, Li C. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4. *Int Immunol* 2000; 12:1311-8.
49. Machuca MA, Suárez EU, Echeverría LE, Martín J, González CI. SNP/haplotype Associations of CCR2 and CCR5 Genes with Severity of Chagasic Cardiomyopathy. *Hum Immunol* 2014; 75:1210-15.
50. Frade AF, Pissetti CW, Ianni BM, Saba B, Lin-Wang HT, Nogueira LG et al. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infect Dis* 2013; 13:587.
51. Nogueira LG, Santos RH, Ianni BM, Fiorelli AI, Mairena EC, Benvenuti LA et al. Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in Chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1867.
52. Flórez O, Martín J, González CI. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Hum Immunol* 2012;73:852-8.
53. Hardison JL, Wrightsman RA, Carpenter PM, Kuziel WA, Lane TE, Manning JE. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite

replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 2006; 74:135-43.

54. Marino AP, Silva AA, Santos PV, Pinto LM, Gazinelli RT, Teixeira MM et al. CC-chemokine receptors: a potential therapeutic target for *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; Suppl 1:93-6.

55. 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.

56. Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Busek SC, Teixeira MM, Silva JS et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect Immun* 2005;73:7960-6.

57. 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.

58. Calzada JE, Nieto A, Beraún Y, Martín J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 2001;58:154-8.

59. Fernández-Mestre MT, Montagnani S, Layrisse Z. Is the CCR5-59029-G/G genotype a protective factor for cardiomyopathy in Chagas disease?. *Hum Immunol* 2004;65:725-8.

60. Roffê E, Oliveira F, Souza AL, Pinho V, Souza DG, Souza PR et al. Role of CCL3/MIP-1alpha and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes Infect* 2010;12:669-76.
61. Villalta F, Zhang Y, Bibb KE, Kappes JC, Lima MF. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun* 1998;66:4690-5.
62. Petray P, Corral R, Meckert P, Laguens R. Role of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2002;83:205-11.

5. APÊNDICES

5.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



“Marcadores imunogenéticos relacionados à doença de Chagas”

FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Conselho Nacional de Saúde - Resolução CNS 196/96)

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa denominada “Marcadores imunogenéticos relacionados à doença de Chagas”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (Parecer 009/2011) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP Parecer 623/2011). *Trypanosoma cruzi* é o parasita que causa a doença de Chagas e essa doença pode ser transmitida aos seres humanos pela picada do inseto conhecido como “bicho barbeiro”, acarretando problemas cardíacos, esofágicos e intestinais.

Essa pesquisa tem como objetivos identificar os aspectos marcadores imunogenéticos (características genéticas e biológicas para determinar se essas características genéticas favorecem ou não a infecção por *T. cruzi*. Os resultados desta pesquisa poderão ajudar na compreensão dos fatores biológicos que influenciam a infecção pelo *T. cruzi* e poderão beneficiar você e muitas outras pessoas.

Se os resultados desta pesquisa demonstrarem que os fatores genéticos se relacionam com a suscetibilidade à doença de Chagas, eles poderão ajudar a compreender a importância das variações genéticas que existem nas populações para a orientação de programas de esclarecimento, educação, prevenção e mesmo tratamento de doenças como a de Chagas. Se o resultado de seu exame for positivo (reagente) para a doença de Chagas, não haverá necessidade de aconselhamento genético, pois esta doença é causada por um microrganismo chamado *Trypanosoma cruzi* e não é transmitida de pais para filhos.

A sua participação nessa pesquisa é voluntária e de extrema importância e você não perderá os benefícios do atendimento médico aos quais tem direito, caso decida não participar ou mesmo se você se retirar dessa pesquisa a qualquer tempo. Você poderá ter acesso a todos os seus dados coletados para esta pesquisa bem como aos resultados de todos os exames realizados nas amostras de seu sangue e terá também o direito de retirar a amostra ou quaisquer de seus dados de nosso banco de armazenamento de dados no momento em que você desejar. Em hipótese alguma seus dados serão divulgados de forma individual.

Para participar como voluntária nessa pesquisa será necessário:

1. Você responder um questionário sobre você e seus hábitos de vida. Todas as informações a seu respeito serão mantidas em absoluto sigilo.
2. Você nos autorizar a colher uma amostra de seu sangue para exames da doença de Chagas e para a identificação dos seus tipos sanguíneos ABO, Secretor e Lewis. A coleta de sangue é realizada com a introdução de uma agulha estéril na veia e de acordo com a sua sensibilidade, você poderá sentir uma leve ardência no local. O risco da coleta de sangue poderá incluir vermelhidão e raramente deixa o local de introdução da agulha inchado e com manchas roxas. O seu sangue será utilizado apenas para análises científicas e será estocado em um banco de amostras do Laboratório de Imunogenética, podendo ser utilizado para novas pesquisas, dentro de no máximo cinco anos. Quaisquer análises adicionais a serem realizadas em sua amostra de sangue deverão obrigatoriamente estar vinculadas ao presente projeto. Você deve saber que não haverá riscos de qualquer tipo de contaminação durante a coleta de seu sangue, pois o material utilizado será individual e não contaminado. Esse material é totalmente estéril (seringa, agulha, algodão com álcool) e único para cada pessoa. Após a coleta de seu sangue, as agulhas, seringas e algodão utilizados serão colocados em saco de lixo e descartados em local seguro. Esses procedimentos serão realizados por profissionais com experiência.

Se for seu desejo, você será informada (o) de todos os resultados dos exames que serão realizados em seu sangue e eles serão mantidos em absoluto sigilo. Se essa pesquisa for encerrada antes do período previsto, você também será informada.

Caso ocorra danos de quaisquer natureza durante a coleta de sua amostra de sangue, você receberá toda assistência médica gratuitamente.

Se você tiver qualquer dúvida sobre essa pesquisa ou mesmo sobre lesões relacionadas à coleta de sangue, entre em contato com o Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos pelo telefone ou pelo endereço abaixo indicados. Caso você tenha qualquer dúvida sobre seus direitos como sujeito de pesquisa, você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pelo telefone (17) 3201-5813.

Você receberá uma cópia deste formulário de consentimento livre e esclarecido assinado e datado.

Declaração do sujeito da pesquisa

Eu voluntariamente aceito participar da pesquisa “Marcadores imunogenéticos relacionados à doença de Chagas”. Autorizo a estocagem da amostra de meu sangue no banco de amostras do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e sua utilização para novas pesquisas, desde que seja mantido o sigilo absoluto das informações por mim prestadas. Li e compreendi essa declaração de consentimento livre e esclarecido e os riscos descritos. Entendo que posso retirar meu consentimento ou retirar-me dessa pesquisa a qualquer momento, sem perder nenhum benefício aos quais tenho direito.

Desejo saber os resultados de meus exames Não desejo saber os resultados de meus exames

..... de de

Responsável pela discussão do consentimento livre e esclarecido

Assinatura do sujeito da pesquisa ou seu representante legal

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
Responsável pelo Laboratório de Imunogenética
Depto. de Biologia Molecular - FAMERP

Laboratório de Imunogenética - Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 - São José do Rio Preto - 15090-000
Fones: (17) 3201-5854 (Laboratório)

5.2 Ficha de Dados Epidemiológicos



"Marcadores imunogenéticos relacionados à doença de Chagas"
FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO



FICHA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

No. Prontuário:	Data da coleta:	Código do projeto:
-----------------	-----------------	--------------------

Dados da paciente:

Nome:	DN:	
Local de nascimento:	Idade:	
Endereço atual:	N ^o :	
Cidade:	Estado:	Telefone:

Você contraiu algumas dessas doenças infecto-parasitárias?

	Sim	Não		Sim	Não		Sim	Não
Citomegalovírus			Mononucleose			Leishmaniose		
Rubéola			Malária			Toxoplasmose		
Catapora			Herpes			Chagas		
Dados clínicos:						Sim	Não	
Você já recebeu transfusão de sangue?								Tempo?
Você já teve ou tem animal doméstico em casa?								Qual?
Você tem o hábito de andar descalça no solo?								
Você tem o hábito de tomar leite cru?								Qual?
Você come carne crua ou mal cozida de qualquer animal?								Qual?
Você lava os legumes e verduras?								
Você teve gravidez anterior?								Quantas?
Você teve filho prematuro?								Quando?
Você teve algum aborto?								Quantos?
Você sabe seu tipo sanguíneo e seu fator Rh?								Qual?
Dados ambientais:								
Você mora em zona: urbana () rural () morou zona rural () onde?								
Qual o tipo de moradia? alvenaria () madeira () Barro ou pau-a-pique () própria () alugada () cedida () outro () especificar								
Tem rede de esgoto? Sim () não () Se não qual o tipo? fossa () outro () especificar								
Você bebe água: filtrada () fervida () torneira ()								
Qual o destino do lixo? coleta pública () outro () especificar								
Onde você mora tem: ratos () baratas () moscas ()								
Qual seu nível escolaridade?								
Qual a renda familiar em salários mínimos? 1 () 2 () 3 () 4 () acima de 4 ()								

Etnia: Pac.: _____ Pai: _____ Mãe: _____

OBS:

6. ANEXOS

6.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



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 009/2011

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 6685/2010 sob a responsabilidade de Luiz Carlos de Mattos, com o título "Marcadores imunogenéticos relacionados à doença de Chagas" está de acordo com a Resolução do 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, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 10 de janeiro de 2011.


Prof. Dr. Fernando Batigália
Coordenador do CEP/FAMERP