



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Citocinas inflamatórias em pacientes com miocardiopatia chagásica, de acordo com tratamento prévio com benznidazol**

**Luan Oliveira Barreto**

Salvador (Bahia)  
Novembro, 2015

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UFBA/SIBI/Bibliotheca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira  
(elaborada pela Bibl. **SONIA ABREU**)

Barreto, Luan Oliveira

B273 Citocinas inflamatórias em pacientes com miocardiopatia chagásica, de acordo de acordo com o tratamento prévio com benznidazol / Luan Oliveira Barreto. Salvador: LO Barreto, 2015.

vii, 49 fls.: [il., tab.].

Professor orientador: Edmundo José Nassri Câmara.

Monografia como exigência parcial e obrigatória para Conclusão de Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB), da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

1. Chagas. 2. Citocinas. 3. Nitroimidazóis. I. Câmara, Edmundo José Nassri. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. III. Título.

CDU – 616.937



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA  
BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA  
BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Citocinas inflamatórias em pacientes com miocardiopatia chagásica, de acordo com tratamento prévio com benznidazol**

**Luan Oliveira Barreto**

Professor orientador: **Edmundo José Nassri Câmara**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2015.1, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)  
Novembro, 2015

**Monografia:** *Citocinas inflamatórias em pacientes com miocardiopatia chagásica, de acordo com tratamento prévio com benznidazol*, de **Luan Oliveira Barreto**.

Professor orientador: **Edmundo José Nassri Câmara**

**COMISSÃO REVISORA:**

- **Edmundo José Nassri Câmara** (Presidente, Professor orientador), Professor do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, Chefe do Serviço de Cardiologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos.
- **Jacy Amaral Freire de Andrade**, Professora do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Renée Amorim dos Santos Félix**, Professora do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Selma Alves Valente do Amaral Lopes**, Professora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Maiara Lanna Silva**, Doutoranda do Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPgCS) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:**

Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no IX Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

*Geralmente aqueles que sabem pouco  
falam muito e aqueles que sabem muito  
falam pouco.*

**[Jean-Jacques Rousseau. *Émile ou De  
l'éducation* (1762), Livro IV]**

Aos Meus Pais, **Dr. Roberto Barreto** e **Dra. Ivanete Barreto**, tios **Silvana** e **Aroaldo** e irmãos **Dr. Virgílio**, **Dr. Igor** e **Roberto** pelo apoio incondicional de sempre.

## **EQUIPE**

- Luan Oliveira Barreto, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: [luanob17@hotmail.com](mailto:luanob17@hotmail.com)
- Edmundo José Nassri Câmara, professor da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA;
- Monaliza Santos da Cunha, médica do Hospital Universitário Professor Edgar Santos;
- Vitor Rosa Ramos de Mendonça, médico formado pela Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA;
- Ramon Pithon Gatto, médico formado pela Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA;
- Giuliana Chiaccio Ferraz, médica formada pela Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA;
- Juliana Soares Carvalho, médica formada pela Faculdade de Tecnologia e Ciências;
- Eduardo Senna Amarante, estudante de medicina da Faculdade de Tecnologia e Ciências;
- Lígia Correia Lima, estudante de medicina da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA; e
- Rudá Alves Lessa, estudante de medicina da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)
- Ambulatório Magalhães Neto

### **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)**

### **INSTITUTO EVANDRO BALTHAZAR**

### **SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DA BAHIA**

- Hospital Ana Nery (HAN)

### **CLÍNICA MÉDICA CARDIOLÓGICA**

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

1. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB); e
2. Recursos próprios.

## AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu Professor orientador, Doutor **Edmundo José Nassri Câmara**, pela paciência e disponibilidade durante toda a construção deste trabalho, além do empenho em tocar à frente a pesquisa maior que vem sendo desenvolvida no tema com maestria e liderança.
- ◆ Ao Doutor **Vitor Mendonça** pela análise laboratorial dos marcadores estudados, ajuda na construção do banco de dados e disponibilidade para dúvidas a qualquer tempo.
- ◆ Ao meu Colega **Rudá Alves Lessa**, que juntamente comigo e outros membros da equipe, participou da coleta dos dados e também desenvolveu monografia partindo da mesma pesquisa maior da qual participamos, além da amizade e parceria de sempre, contribuindo assim diretamente para efetivação deste trabalho.
- ◆ Ao amigo **Anderson de Oliveira Dourado**, cientista da computação, pela ajuda e solicitude nas questões gráficas, de formatação e afins com destreza e vasto conhecimento no assunto, ajudando sempre que requisitado e contribuindo para a construção e ajustamento do trabalho na reta final.



## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS</b>	<b>2</b>
<b>I. RESUMO</b>	<b>3</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>5</b>
<b>IV. METODOLOGIA</b>	<b>10</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>12</b>
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>17</b>
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	<b>23</b>
<b>VIII. SUMMARY</b>	<b>24</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>25</b>
<b>X. ANEXOS</b>	
•ANEXO I: Ficha Clínica	34
•ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	35
•ANEXO III: Aprovação do CEP	38

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

### **FIGURAS**

- FIGURA 1. Diferença da resposta imune medida por citocinas e quimiocinas em pacientes com doença de Chagas submetidos a tratamento prévio com benznidazol. **14**

### **TABELAS**

- TABELA 1. Características demográficas e clínicas de pacientes de acordo com tratamento prévio para doença de Chagas. **12**
- TABELA 2. Parâmetros eletrocardiográficos em pacientes de acordo com tratamento prévio para doença de Chagas. **13**
- TABELA 3. Níveis de citocinas e quimiocinas em pacientes de acordo com tratamento prévio para doença de Chagas. **16**

## I. RESUMO

**TÍTULO: Citocinas inflamatórias em pacientes com Miocardiopatia Chagásica, de acordo com tratamento prévio com Benznidazol.**

**INTRODUÇÃO:** A doença de Chagas possui elevada prevalência nos países latinoamericanos, principalmente no Brasil, que apresenta importantes zonas endêmicas na Bahia, onde representa um grave problema de saúde pública. A Miocardiopatia Chagásica (MCC) é de natureza inflamatória, com importante produção de citocinas pró-inflamatórias do Padrão Th1 e quimiocinas. Ocorre em cerca de 30% dos pacientes infectados pelo protozoário cerca de 5 a 30 anos após a infecção, com alto risco de evoluir para Insuficiência Cardíaca (IC) progressiva e morte. Os fatores que determinam a composição do infiltrado inflamatório e contribuem para a migração e acúmulo das células inflamatórias dentro do tecido cardíaco na MCC são ainda desconhecidos.

**OBJETIVOS:** investigar a associação dos níveis de citocinas pro-inflamatórias com estágio evolutivo da cardiopatia em pacientes com MCC, relacionando com e sem tratamento com benznidazol. **METODOLOGIA:** estudo de corte transversal com pacientes chagásicos. Amostras de sangue dos pacientes foram usadas para análise laboratorial dos níveis circulantes de diversas citocinas pró-inflamatórias. Testes estatísticos foram usados para análise dos dados obtidos e os pacientes foram estratificados em dois grupos: tratados e não tratados com benznidazol.

**RESULTADOS:** na análise de agrupamento hierárquica, a expressão média de citocinas/quimiocinas do grupo não tratados tendeu a ser mais baixa. Níveis elevados de muitos marcadores imunes foram associados ao grupo de tratados, na análise por regressão multinomial, com diferença estatisticamente significativa de alguns destes marcadores. Interleucina-17 (IL-17) e Fator de Necrose Tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) foram os melhores marcadores para distinguir os indivíduos com ou sem tratamento prévio com benznidazol. **CONCLUSÕES:** a expressão de citocinas foi maior nos pacientes tratados com benznidazol, surpreendentemente algumas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$ , mas também em algumas citocinas moduladoras da atividade inflamatória, como IL-17 e IL-4. O atual estudo torna-se importante por se tratar de uma doença negligenciada em termos de saúde pública e com pouca investigação científica acerca de alvos terapêuticos promissores pra impedir a progressão da doença de Chagas.

**Palavras chaves:** 1. Doença de Chagas; 2. Citocinas; 3. Nitroimidazóis

## **II. OBJETIVOS**

### **1. Primário:**

Investigar a associação dos níveis séricos de citocinas, em relação ao estágio evolutivo da miocardiopatia chagásica, de acordo com o tratamento etiológico prévio com benznidazol.

### **2. Secundários:**

1) Avaliar o padrão de diversas citocinas séricas em pacientes chagásicos em diferentes estágios da miocardiopatia;

2) correlacionar níveis séricos de citocinas com o grau de acometimento da função ventricular;

3) Identificar qual ou quais citocina(s) apresenta(m) maior poder discriminatório em relação ao tratamento prévio com benznidazol.

### III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, doença descrita inicialmente por Carlos Chagas (1909), é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A transmissão tem como vetor um triatomíneo hematófago na maioria dos casos, além da transmissão por transfusão sanguínea, congênita e outras menos representativas (Wendel, 1998).

A doença chagásica constitui um importante problema de saúde pública na América Latina há muitos anos. Mundialmente, estima-se que 18 milhões de pessoas encontram-se cronicamente infectadas pelo *T. cruzi*. No Brasil, 17 mil mortes foram atribuídas à doença de Chagas em 1995 (Akhavan, 1997). Dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002) apontam para uma incidência de aproximadamente 300.000 novos casos por ano. Em contra partida, Moncayo (2003) afirma que um programa conjunto dos países da América do Sul foi responsável por interrupção da transmissão da doença de Chagas no Uruguai em 1997, Chile em 1999 e em 8 dos 12 estados endêmicos no Brasil em 2000, sendo responsável por um decréscimo de mais de 70% de incidência da infecção em toda América Latina. Nesse mesmo sentido, Schofield et al (2006) aponta para diminuição de 100 milhões para aproximadamente 40 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco para aquisição do protozoário no território latino-americano entre 1990 e 2006. O Brasil, um dos grandes focos de infecção no passado, recebeu o certificado de interrupção da transmissão vetorial da doença em 2006 (Abad-Franch et al, 2013).

Não obstante todos os esforços feitos na implantação de programas de controle da transmissão vetorial e em bancos de sangue, responsável por expressiva diminuição da incidência de novos casos (Moncayo, 2003) e consequentemente da morbimortalidade proveniente da forma crônica. Milhões de pacientes portadores da enfermidade clínica em questão que continuam sob risco de vida na América Latina, no Brasil e na Bahia, necessitando do tratamento adequado. Esses pacientes já infectados continuam sob potencial risco de desenvolver qualquer das formas clínicas da doença, em especial do comprometimento cardíaco.

A história clínica natural da doença é constituída pelas fases aguda e crônica. Na fase aguda, os parasitas se espalham difusamente pelo organismo do paciente, porém a

resposta imune consegue controlar essa disseminação, o que estabelece uma infecção crônica pelo *T. cruzi* com baixos índices de parasita no corpo. Apesar de geralmente ser assintomática, a fase aguda pode cursar com miocardite e meningoencefalite. Por não eliminar completamente o parasita do corpo, foi-se descrito o conceito de “imunidade não estéril” (Martin *et al*, 1987). A fase crônica pode ser identificada como: indeterminada, cardíaca e digestiva. Dos indivíduos infectados, cerca de 70% apresentam a forma indeterminada, caracterizada por ausência de manifestações clínicas significantes, não apresentando assim alterações cardíacas ou digestivas. Os indivíduos podem evoluir para alguma forma clínica sintomática após um intervalo de tempo de 10 a 20 anos da primoinfecção (Ribeiro & Rocha, 1998). A forma digestiva, que acomete cerca de 8-10%, é caracterizada por uma dilatação do esôfago e/ou cólon. A apresentação mista cardíaca e digestiva é possível e acontece em cerca de até 3% dos casos (Pompilio *et al*, 1998).

Apenas 20-30% dos indivíduos infectados apresentam a miocardite crônica chagásica (MCC), com alto risco de desenvolver insuficiência cardíaca (IC) progressiva e morte. Entretanto, mesmo a forma cardíaca apresenta uma evolução variável, que vai desde o lesões discretas, com escassas alterações eletrocardiográficas, até formas graves de miocardiopatia e insuficiência cardíaca (Rossi, 1991; WHO, 2002; Rocha *et al*, 2003). A maioria (mais de 75%) dos pacientes com alterações eletrocardiográficas, persistem assintomáticos por longo período de tempo, sem desenvolver IC (Espinosa R 1985; Viotti R 2006). Os mecanismos desta evolução diversa da doença de Chagas ainda não são bem conhecidos.

O tecido cardíaco, na vigência de MCC, tem como principal característica anatomopatológica uma miocardite difusa, com destruição de células cardíacas que são substituídas por fibrose e por processo inflamatório difuso com predomínio de células mononucleares, danificando os cardiomiócitos (Higuchi *et al*, 1987). Este processo é um possível efector dos danos ao tecido, tendo como composição macrófagos (50%), células B (10%), células T (40%), com uma predominância de 2:1 de células T CD8+ sobre células T CD4+ (Milei *et al*, 1992; Higuchi *et al*, 1993).

Citocinas e quimiocinas são grupos de moléculas secretadas pelas células do sistema imune e por células não leucocitárias envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas inflamatórias. Essas moléculas podem

estimular ou inibir a resposta imune, sendo consideradas como mediadores da resposta. Estes mediadores têm um importante papel na polarização da resposta imune e na manutenção e diferenciação de células e estão diretamente associadas com a forma de apresentação das doenças resultantes de infecções. No curso da doença chagásica, a literatura mostra que citocinas inflamatórias são essenciais na fase aguda da infecção e são produzidas em níveis elevados na forma crônica (Ribeirao *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2003; Abel *et al.*, 2001).

Na doença de Chagas crônica e na miocardite crônica chagásica, há importante produção de citocinas pró-inflamatórias do padrão Th1 e quimiocinas, mesmo na ausência de disfunção ventricular. Tem sido demonstrado que células mononucleares que infiltram o tecido cardíaco dos pacientes portadores da miocardite crônica chagásica produzem algumas dessas citocinas. Ainda não se sabe, no entanto, quais são os fatores determinantes para a composição do infiltrado inflamatório que se instala e contribuintes para a migração e acúmulo das células da inflamação dentro do tecido cardíaco na miocardite crônica chagásica.

A inflamação tem importante papel na patogênese e na progressão de muitas formas de IC (Braunwald E 2008), e na miocardite crônica chagásica é ainda mais evidente e exacerbada, tendo, portanto, pior prognóstico do que em outras formas de IC. Marcadores da inflamação, como as citocinas pró-inflamatórias (interleucinas 1, 6 e 18, e o TNF-alfa), bem como a proteína-C reativa (PCR), têm sido descritos como alterados na IC. Estes têm um papel importante na estratificação e na identificação de indivíduos assintomáticos com risco de desenvolver IC.

Alguns marcadores de inflamação como a PCR e a interleucina 6 (IL6) parecem estar relacionados com a progressão e com as fases mais avançadas da cardiopatia chagásica (Lopez L et al. 2006). Este assunto ainda é controverso e não está bem estabelecido, necessitando de investigações mais aprofundadas em diferentes populações e com diferentes metodologias, para que estes dados possam ser utilizados clinicamente.

Os indivíduos com sorologia positiva e eletrocardiograma (ECG) normal ou alterado e sem IC, portanto na fase assintomática, constituem uma grande proporção dos chagásicos numa população onde a doença de Chagas é endêmica, incluindo a Bahia. A

identificação de marcadores ou preditores de evolução desfavorável para IC e morte é um grande desafio científico para a fase inicial da doença, ainda sem sintomas, e pode, portanto, mudar o panorama clínico atual. Diante das possibilidades de tratamento etiológico da doença, este conhecimento é essencial do ponto de vista custo-benefício, o que demonstra a importância desta pesquisa e de outras seguindo linhas de pensamento equânimes e/ou próximas.

Atualmente, apenas duas drogas são consideradas eficazes para o tratamento da doença de Chagas nas fases agudas e crônicas: nifurtimox e benznidazol (Coura 1996, Coura et al. 1978, 1997). O benznidazol (droga utilizada no atual estudo) é o fármaco mais indicado nos países latino-americanos e o mais usado no Brasil para o tratamento antiparasitário na doença de Chagas. O mecanismo de ação do benznidazol está relacionado à redução do nitrogênio de componentes do parasita, a ligação de metabólitos do DNA nuclear e do k-DNA do *T. cruzi* e os lipídios e proteínas do parasita (Polak & Richle 1978, Diaz de Taranzo et al. 1988). Coura et al. (1997) demonstraram que o benznidazol foi mais eficaz que o nifurtimox para suprimir a parasitemia durante a fase crônica da doença de Chagas, com efeito supressor maior e efeitos secundários semelhantes. Coura & Borges-Pereira (2011) afirmam que os esquemas clássicos de tratamento na fase crônica são com benznidazol na dose de 5-7,5 mg/kg/dia, divididos em duas ou três doses, durante 60 dias. Porém os mesmos autores referem que o tratamento por 30 dias podem ter o mesmo efeito de supressão parasitária com menos efeitos colaterais. A presença de efeitos colaterais, principalmente reações cutâneas e náuseas, é uma das grandes limitações para o sucesso terapêutico, levando ao abandono do tratamento pelos pacientes, chegando à taxa de 40% nos pacientes que começam com benznidazol (Murcia et al., 2013).

Apesar de efetividade do benznidazol para combater o parasita durante a fase aguda da doença, a sua eficácia não está bem estabelecida na fase crônica da doença de Chagas. Publicações prévias mostraram que, apesar de não erradicar o parasita na fase crônica, o tratamento antiparasitário contribui para reduzir a parasitemia e rearranjar a resposta imune do hospedeiro, levando a uma resposta inflamatória balanceada que é crucial para controlar a morbidade da doença (Garcia et al, 2005; Viotti et al, 2006). Independentemente dessas descobertas, ainda existem muito poucos estudos focando nas mudanças imunológicas decorrentes do tratamento com benznidazol durante a fase crônica da doença de Chagas. Segundo Quijano-Hernandez & Dumonteil (2011), um



entendimento coerente do padrão imunológico que se sucede ao tratamento etiológico da doença de Chagas vai, com certeza, contribuir para determinar novas perspectivas para imunoprevenção e terapia destes pacientes.

A Bahia é um estado com alta prevalência da doença de Chagas, sendo documentada a prevalência média de 5,4% e ocupando o posto de quinta maior prevalência do país (Camargo *et al.*, 1984). Além disso, a endemia da doença de Chagas na Bahia ocorre desigual em seu espaço geográfico, incluindo áreas com altas prevalências e áreas com baixíssimas prevalências.

A Bahia tem tradição de pesquisa em doença de Chagas. Muitos aspectos epidemiológicos, anatomopatológicos, clínicos e ecocardiográficos foram descritos por pesquisadores da Universidade Federal da Bahia (Andrade & Andrade, 1955; Rocha & Andrade, 1955; Andrade & Sadigursky, 1971; Mota & col.; Câmara EJM et al. 1983, 1986; Câmara EJM 1993). A atual pesquisa constitui um passo a mais na elucidação dos efeitos do tratamento antiparasitário na doença de Chagas, ao investigar a associação dos níveis séricos de citocinas em relação ao estágio evolutivo da miocardiopatia chagásica com grupos de pacientes tratados e não tratados, e pode servir de base para futuras investigações.

#### IV. METODOLOGIA

##### **Delineamento do Estudo:** Corte Transversal

**Amostra:** A população de estudo foi formada por indivíduos com Doença Chagásica Crônica, confirmada por teste sorológico positivo para Chagas - ELISA por IgG. Os pacientes foram recrutados de forma aleatória provenientes de dois centros de referência: Ambulatórios de Cardiologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, e da clínica Climecar em uma cidade do interior baiano (Itaberaba) endêmica da Doença de Chagas, entre os anos 2012 e 2013 de acordo com tratamento prévio com benznidazol. Informação de tratamento prévio com benznidazol foi obtida dos registros médicos e um tratamento completo foi considerado como: 5 mg/kg/dia por sessenta dias. Critérios de exclusão: indivíduos com idade maior que 70 anos; pacientes com história prévia de hospitalização por problema cardíaco ou de evento arritmico grave documentado tipo taquicardia ventricular ou bloqueio atrioventricular do 2º ou 3º grau; pacientes com fibrilação atrial; portadores de marca-passo; tratamento incompleto com benznidazol; cirurgia cardíaca prévia; câncer ou outras doenças inflamatórias crônicas (como doenças do tecido conectivo e reumáticas). Os indivíduos foram agrupados em dois grupos com Doença Chagásica Crônica: tratados com benznidazol (n=31) e não tratados (n=40).

**N amostral:** N amostral estimado de 70 pacientes chagásicos baseando-se num risco relativo de 4 para progressão da doença nos indivíduos com níveis elevados dos marcadores inflamatórios com alfa de 0,05 e poder de estudo de 80%.

**Medidas do plasma:** Amostras de sangue dos pacientes chagásicos foram colhidas na entrada ao estudo por punção venosa e o plasma heparinizado de cada paciente foi separado por centrifugação e estocado a -70 °C até a análise de imunoenensaio. Níveis circulantes de diversas citocinas e quimiocinas incluindo IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF, CCL2, CCL4, GCSF, GMCSF foram medidos usando ensaio único multiplex de acordo com protocolo dos fabricantes (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Ao ser incluído no estudo o paciente, foi preenchida a FICHA DE ADMISSÃO (vide anexo 1) com os dados demográficos e clínicos iniciais. Nesta ficha foram anotados também os primeiros resultados dos exames laboratoriais, ECG, Radiografia de tórax e dos marcadores inflamatórios.

Devido à escassez dos kits de análise dos marcadores inflamatórios, suficientes para análise de apenas 58 amostras de sangue (N amostral total de 71 pacientes), as amostras foram aleatoriamente escolhidas para análise, sendo analisadas 26 amostras do grupo tratado e 32 do grupo não tratado.

**Métodos estatísticos:** Na análise exploratória dos dados, as tabelas de frequência foram construídas e os testes Qui-quadrado ou Fischer exato foram aplicados para avaliar a associação entre variáveis qualitativas. As variáveis quantitativas foram testadas por distribuição de Gauss com o total da amostra usando os testes de normalidade D'Agostino e Pearson. Todas as variáveis não apresentavam distribuição normal, portanto testes não paramétricos foram usados. Nesse contexto, o teste de Mann-Whitney U foi usado para avaliar as diferenças entre os dois grupos clínicos. Análise de regressão multinominal ajustada para idade e gênero foi usada para testar associações entre as medidas da resposta imune e os diferentes grupos clínicos baseados em tratamento prévio com benznidazol (tratados e não tratados).

A análise estatística foi realizada usando os programas GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., USA), SPSS 19.0 (IBM, Armonk, NY, USA) e JMP 11.0 (SAS, Cary, NC, USA). Todos os testes foram bicaudados e foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valores de  $p \leq 0,05$ .

**Aspectos éticos:** Foi assegurado o caráter voluntário da participação no estudo, visto que foi explicado a cada convidado em participar, sobre o questionário (Anexo I) a ser aplicado e que a formalização da inserção seria através da assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II). Foi informado, também, que a recusa em participar e a desistência em continuar de modo algum afetaria o tratamento que o paciente receberia. Foi esclarecido, ainda, que dentre os resultados a serem divulgados se resguardaria as imagens e as informações que permitissem a identificação dos pacientes.

O estudo teve a aprovação do Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, CEP nº 0057.0.442.000-10 (Anexo III).

## V. RESULTADOS

### Características demográficas e clínicas

As características demográficas e clínicas são apresentadas na Tabela 1. A maioria dos indivíduos dos grupos tratados e não tratados era do sexo feminino (61,29% e 67,50% respectivamente) e nenhuma diferença foi encontrada analisando-se o gênero ( $p=0,6238$ ) e idade ( $p=0,3938$ ). O grupo não tratado tem diagnóstico de doença de Chagas há mais tempo que o grupo tratado (mediana de 15 e 06 anos, respectivamente.  $p=0,0003$ ). Além disso, foi reportada mais dispneia no grupo não tratado (67,50%;  $n=27$ ) que no tratado (25,81%;  $n=8$ ;  $p=0,0007$ ), e NYHA (New York Heart Association)

**Tabela 1. Características demográficas e clínicas de pacientes de acordo com tratamento prévio para doença de Chagas (n=71).**

n (%)	Tratados n = 31	Não tratados n = 40	Valor de p
<b>Homens</b>	12 (38,71)	13 (32,50)	0,6238 *
<b>Idade <sup>1</sup></b>	51 (47-55)	51,5 (49-56)	0,3938 **
<b>Tempo de diagnóstico <sup>1</sup></b>	6 (4-10,50)	15 (8-20)	0,0003 **
<b>Dispneia</b>	8 (25,81)	27 (67,50)	0,0007 *
<b>Palpitação</b>	15 (48,39)	28 (70,00)	0,0876 *
<b>Síncope</b>	7 (22,58)	17 (42,50)	0,1283 *
<b>Edema de MMII</b>	11 (35,48)	9 (22,50)	0,285 *
<b>Hipertensão</b>	15 (48,39)	22 (55,00)	0,6368 *
<b>Diabetes II</b>	1 (3,23)	5 (12,50)	0,2218 *
<b>Doença Arterial Coronariana</b>	0 (0,00)	3 (7,50)	0,2515 *
<b>AVE prévio</b>	0 (0,00)	2 (5,00)	0,501 *
<b>Classe funcional NYHA:</b>			
<b>I</b>	22 (70,97)	14 (35,00)	0,0107 #
<b>II</b>	7 (22,58)	21 (52,50)	
<b>III/IV</b>	2 (6,45)	5 (12,50)	

Todos os dados expressos em n (%), exceto se especificados. <sup>1</sup>Medidas usadas: mediana (IIQ); IIQ: Intervalo interquartil; NYHA: New York Heart Association; MMII: Membros Inferiores; AVE: Acidente Vascular Encefálico; \* Teste exato de Fischer foi usado; \*\* Teste de Mann-Whitney foi usado; # Teste qui-quadrado foi usado.

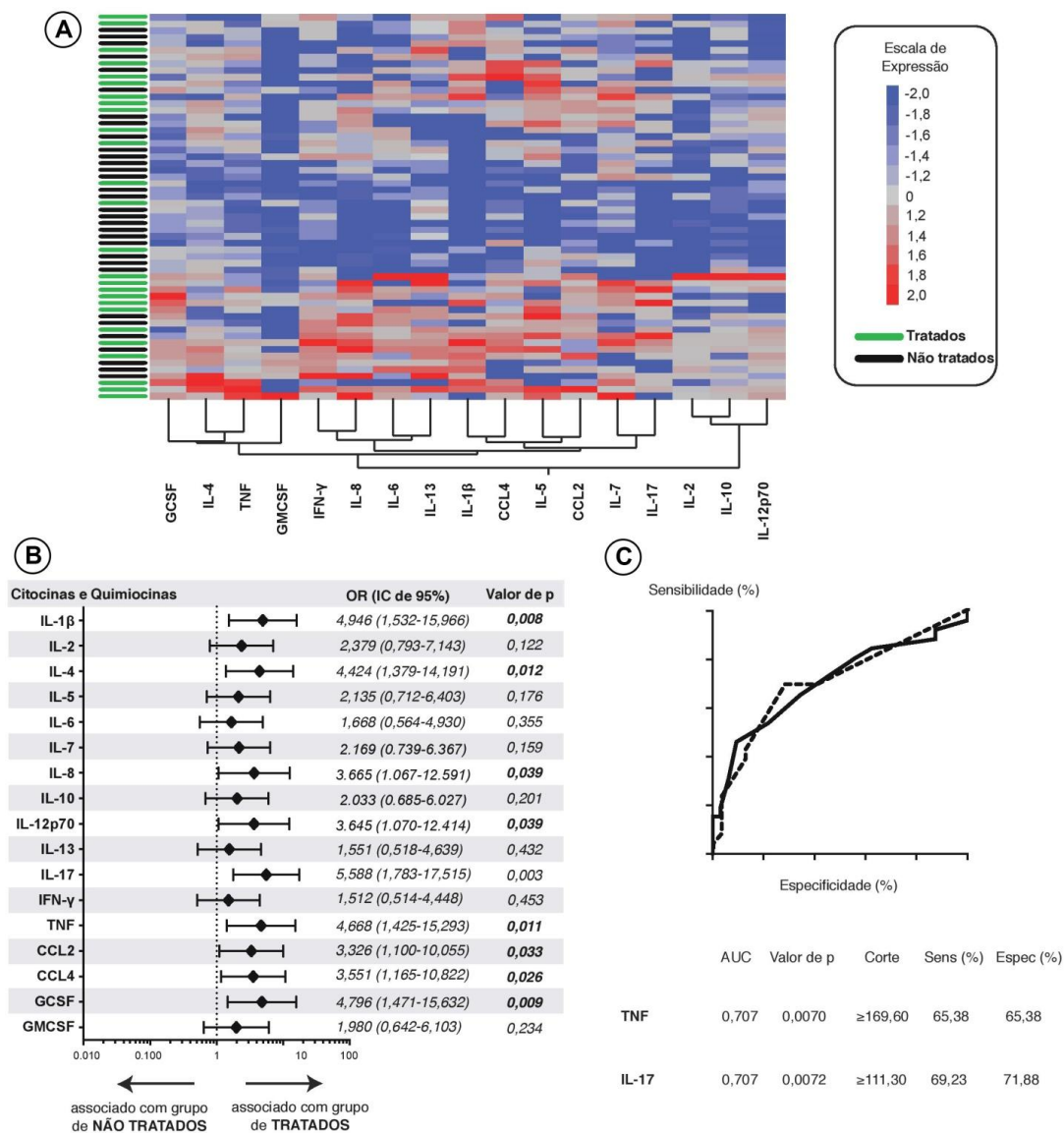
classe funcional I no grupo tratado (70,97%; n=22) do que no não tratado (35,00%; n=14; p=0,0107). Nenhuma outra diferença foi encontrada nos outros parâmetros clínicos (palpitação, síncope, edema, hipertensão, diabetes tipo 2 e acidente vascular encefálico), de acordo com tratamento prévio com benznidazol.

Nos dados do eletrocardiograma, sumarizados na Tabela 2, foi descrito que o grupo não tratado (28,12%; n=9) teve mais extrassístoles ventriculares que o tratado (28,12% VS 0%; p=0,0021). Os outros parâmetros foram iguais no ECG entre os grupos de estudo.

**Tabela 2. Parâmetros eletrocardiográficos em pacientes de acordo com tratamento prévio para doença de Chagas (n=62).**

<b>n (%)</b>	<b>Tratados n = 30</b>	<b>Não tratados n = 32</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Ritmo sinusal</b>	29 (96,67)	30 (93,75)	1,0000 *
<b>Frequência cardíaca <sup>1</sup></b>	62 (58,25-71,25)	62 (60-75)	0,4808 **
<b>Sobrecarga ventricular</b>	3 (10,00)	3 (9,37)	1,0000 *
<b>Extrassístole S supraventricular</b>	1 (3,33)	0 (0,00)	0,4839 *
<b>Extra sístole ventricular</b>	0 (0,00)	9 (28,12)	0,0021 *
<b>Bloqueio atrioventricular</b>	0 (0,00)	2 (6,25)	0,4923 *
<b>Bloqueio de ramo direito</b>	7 (23,33)	10 (31,25)	0,5746 *
<b>Bloqueio de ramo esquerdo</b>	0 (0,00)	1 (3,12)	1,0000 *
<b>Hemibloqueio anterior esquerdo</b>	4 (13,33)	8 (25,00)	0,3391 *
<b>Hemibloqueio posterior esquerdo</b>	0 (0,00)	0 (0,00)	1,0000 *
<b>Alteração da repolarização</b>	10 (33,33)	15 (46,87)	0,3107 *

Todos os dados expressos em n (%), exceto se especificados. <sup>1</sup>Medidas usadas: mediana (IIQ); IIQ: intervalo interquartis; \* Teste exato de Fischer foi usado; \*\* Teste de Mann-Whitney foi usado.



**Figura 1.** Diferença da resposta imune medida por citocinas e quimiocinas em pacientes com doença de Chagas submetidos a tratamento prévio com benznidazol. **Gráfico A:** citocinas e quimiocinas foram analisadas por meio de análise de agrupamento hierárquico bifatorial (método de Ward) de acordo com tratamento prévio com benznidazol. As cores mostradas na escala de expressão (azul, cinza, vermelho) representa a amplitude dos valores medianos (transformados por log) calculados para cada marcador. Cada coluna representa um citocina/quimiocina e as linhas são os participantes do estudo; aqueles tratados estão representados em retângulos verdes e aqueles que não tiveram tratamento em retângulos pretos. **Gráfico B:** análise de regressão multinominal ajustada para idade e sexo com cálculo da *odds ratio* (OR) e 95% do intervalo de confiança (IC), representados por ícone e barra respectivamente, foi realizado para saber se a resposta imune é diferente de acordo com o tratamento prévio. **Gráfico C:** as duas moléculas (TNF e IL-17) com maiores áreas sobre a curva (AUC, do inglês *area under the curve*) por análise de curva ROC (do inglês: *receiver operator characteristic curve*) são mostradas com os valores de corte, sensibilidade e especificidade. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### Diferenças entre os grupos nos níveis dos imunomarcadores

A Figura 1 mostra análises estatísticas das citocinas e quimiocinas comparando os grupos de tratados e não tratados previamente com benznidazol. Na análise de agrupamentos hierárquica bifatorial, usando o método de Ward, foi observado que o grupo de não tratados (barras pretas) teve uma tendência de ser agrupado no meio do mapa com uma expressão média de citocinas/quimiocinas baixa (Gráfico A). Níveis elevados de muitos marcadores imunes foram associados com o grupo de tratados (comparado ao grupo de não tratados), análise feita por regressão multinominal ajustada para idade e gênero: IL-1 $\beta$  (OR: 4,946; IC de 95%: 1,532-15,966; p=0,008); IL-4 (OR: 4,424 IC de 95%: 1,379-14,191; p=0,012); IL-8 (OR: 3,665 IC de 95%: 1,067-12,591; p=0,039); IL-12p70 (OR: 3,645 IC de 95%: 1,070-12,414; p=0,039); IL-17 (OR: 5,588 IC de 95%: 1,783-17,515; p=0,003); TNF- $\alpha$  (OR: 4,668 IC de 95%: 1,425-15,293; p=0,011); CCL2 (OR: 3,326 IC de 95%: 1,100-10,055; p=0,033); CCL4 (OR: 3,551 IC de 95%: 1,165-10,822; p=0,026); e GCSF (OR: 4,796 IC de 95%: 1,471-15,632; p=0,009) (Gráfico B). Além disso, TNF e IL-17 foram os melhores marcadores, i.e. com maiores áreas sob a curva (do inglês AUC: *area under the curve*), para distinguir indivíduos com ou sem tratamento prévio com benznidazol pelas curvas de ROC (do inglês: *receiver operator characteristic curve*) e estatísticas C (Gráfico C). Um TNF com valor de corte maior que 169,90 pg/mL teve 70,70% de AUC (sensibilidade e especificidade: 65,38%), assim como valor de corte de IL-17 maior que 111,30 pg/mL também teve 70,70% de AUC (sensibilidade: 69,23%, especificidade: 71,88%) para diferenciar os grupos de tratados e não tratados (Gráfico C). Todos os marcadores imunes mensurados estão detalhados na tabela 3.

**Tabela 3. Níveis de citocinas e quimiocinas em pacientes de acordo com tratamento prévio para doença de Chagas.**

Parâmetro em pg/mL	Tratados	Não tratados	Valor
Mediana (IIQ)	n=26	n=32	de p
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	45,74 (1,27-77,96)	1,27 (1,27-45,74)	<b>0,0173</b>
<b>IL-2</b>	25,07 (0,46-77,86)	0,46 (0,46-56,83)	0,2579
<b>IL-4</b>	37,20 (28,65-49,94)	23,29 (8,66-37,20)	<b>0,0250</b>
<b>IL-5</b>	77,85 (44,28-119,30)	54,41 (1,44-84,52)	0,1019
<b>IL-6</b>	66,37 (1,04-154,10)	41,93 (1,04-107,20)	0,1668
<b>IL-7</b>	84,31 (28,35-115,60)	57,98 (28,35-84,31)	0,2051
<b>IL-8</b>	77,32 (6,64-125,50)	8,60 (0,77-96,62)	0,1041
<b>IL-10</b>	15,78 (6,11-26,95)	11,85 (6,11-21,82)	0,2491
<b>IL-12p70</b>	117,90 (8,36-252,90)	79,54 (8,36-156,30)	0,1515
<b>IL-13</b>	204,60 (77,65-354,30)	131,90 (103,10-279,30)	0,3965
<b>IL-17</b>	142,50 (1,22-253,10)	1,22 (1,22-142,5)	<b>0,0039</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1.889,00 (854,60-2776,00)	1.437,00 (1,07-2439,00)	0,3750
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	252,90 (143,70-382,00)	143,70 (58,29-195,60)	<b>0,0060</b>
<b>CCL2</b>	75,30 (42,43-139,80)	42,43 (8,38-75,30)	<b>0,0168</b>
<b>CCL4</b>	62,13 (16,94-84,37)	16,94 (1,05-52,39)	<b>0,0158</b>
<b>GCSF</b>	266,70 (187,20-438,40)	154,50 (154,50-243,30)	<b>0,0127</b>
<b>GMCSF</b>	0,51 (0,51-54,00)	0,51 (0,51-5,96)	0,2156

IIQ: intervalo interquartis; o teste de Mann-Whitney foi usado para todas as comparações; valores de p destacados em negrito significam  $p < 0,05$ .



## VI. DISCUSSÃO

A doença de Chagas constitui uma importante entidade clínica na América Latina e a Bahia representa um dos grandes focos endêmicos da doença. Os danos cardíacos decorrentes da inflamação crônica do músculo cardíaco levam a insuficiência cardíaca congestiva grave e arritmia, conduzindo o paciente a um estado mórbido de prognóstico reservado. Ainda existem muito poucos estudos focando nas mudanças imunológicas decorrentes do tratamento com benznidazol durante a fase crônica da doença de Chagas.

Nesse contexto, essa pesquisa investigou os níveis dos marcadores inflamatórios nos pacientes, comparando os grupos tratados e não tratados previamente com benznidazol. Os resultados do atual estudo são conflitantes, em alguns aspectos, com o que vem sendo descrito na literatura. Na análise de agrupamentos hierárquica bifatorial, o grupo de não tratados obteve uma expressão média de citocinas/quimiocinas baixa, enquanto o grupo de tratados obteve uma expressão média mais alta. Sathler-Avelar et al (2012) encontraram resultados opostos, demonstrando que o tratamento com benznidazol está relacionado a um *down-regulation* na expressão média de citocinas em pacientes sete anos após o tratamento comparado com não tratados, em concordância com outros estudos (Reveli et al., 1999; Piaggio et al., 2001; Bustamante et al., 2008).

Ainda, esse padrão de expressão regulada de citocinas após o tratamento com benznidazol pode contar para a hipótese que o tratamento durante a fase crônica possa ter um impacto de suporte, modulando o perfil de citocinas inflamatórias de pacientes na forma indeterminada da doença, reduzindo as chances de uma evolução para doença cardíaca. (Sathler-Avelar et al, 2006). Entretanto, esse *down-regulation* no perfil de citocinas inflamatórias pode minimamente favorecer a replicação parasitária de focos inflamatórios residuais, considerando a menor eficácia do benznidazol em promover erradicação parasitária na fase crônica da doença de Chagas (Cançado, 2002; Camandaroba et al, 2003; Toledo et al, 2004). Nesse sentido, Sathler-Avelar et al (2012) também investigaram o impacto de antígenos de *T. cruzi* na resposta imune de pacientes tratados com benznidazol e caracterizaram que o perfil de citocinas engatilhou-se após a estimulação antigênica, mostrando um grande impacto na resposta imune inata e adaptativa. Esse achado pode explicar um possível padrão inflamatório mais exacerbado

nos pacientes tratados do que nos não tratados, como foi encontrado e caracterizado no presente trabalho, o que necessita de estudos mais detalhados e complexos.

Nossos dados mostram, através da análise de regressão multinominal ajustada para idade e gênero, níveis elevados de muitos marcadores imunes associados ao grupo de tratados, quando comparado aos não tratados, com significância estatística, a dizer: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-12p70, IL-17, TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL4 e GCSF. Esses dados são notáveis e surpreendentes, haja vista que era esperado justamente o contrário, principalmente nas citocinas e quimiocinas notadamente pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-12, CCL2, CCL4 e IL-1 $\beta$ ).

É descrita a importância vital do interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) tanto na fase aguda quanto na fase crônica. De acordo com Maya et al (2010), durante as fases iniciais da infecção, macrófagos produzem citocinas como IL-12 e TNF- $\alpha$  que induzem a produção de IFN- $\gamma$ . Esse IFN- $\gamma$ , produzido por linfócitos T CD4+ e CD8+, é essencial para controlar a infecção por *T. cruzi* (Une et al., 2003; Sathler-Avelar et al., 2008; Chessler et al., 2009; Sathler-Avelar et al., 2009). Em macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ , o crescimento intracelular parasitário é controlado pela produção de óxido nítrico (NO) (Maya et al., 2010). Por outro lado, várias outras citocinas, incluindo IL-10, IL-4 e *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) têm um importante papel em controlar a intensidade da resposta imune contra o *T. cruzi*, inclusive por regulação negativa da produção de IFN- $\gamma$  (Ferreira et al., 2014) e, assim, prevenir uma indesejada inflamação excessiva de tecido (Freire-de-Lima et al; 2000; Freire-de-Lima et al, 2006; DosReis and Lopes, 2009). De qualquer sorte, IFN- $\gamma$  é essencial para macrófagos matarem parasitas. Além disso, IFN- $\gamma$  modula a produção de citocinas e regula o desenvolvimento apropriado da resposta inflamatória para infecção (Silva et al., 2003). Essa resposta inflamatória é necessária para o controle parasitário, mas uma resposta inflamatória excessiva ou não controlada no tecido cardíaco pode produzir miocardite e associar com formas graves de doença crônica (Sathler-Avelar et al., 2009). Esse comportamento dual do IFN- $\gamma$  em induzir resposta inflamatória tanto na fase aguda quanto na fase crônica que resulta em miocardiopatia chagásica crônica (MCC) é bem descrito por Ferreira et al., 2014), mostrando que na fase crônica, após exacerbação do padrão Th1 de resposta imune, IFN- $\gamma$  leva a destruição inflamatória direta, modulação da expressão gênica do cardiomiócito e progressão para MCC.

Não há dúvidas da importância do TNF- $\alpha$  como mediador e marcador de atividade inflamatória do sistema imunológico. TNF- $\alpha$  é detectável em corações inflamados com MCC (D'Avila Reis et al., 1993), produzido por células T derivadas de biópsia do endomiocárdio (Abel et al., 2001). De fato, moléculas derivadas do *T. cruzi*, incluindo mucinas glicosilfosfatidilinositol-ancoradas, vêm sendo mostradas como indutoras da produção de TNF- $\alpha$  (Ropert et al., 2002). Isso sugere que o TNF- $\alpha$  pode estar envolvido na manutenção da miocardite crônica, gerando uma atividade pró-inflamatória juntamente com IFN- $\gamma$  no miocárdio para combater e controlar a infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, a inflamação gerada pela resposta imune geralmente é exagerada e leva a destruição tecidual concomitantemente. Como descrito acima, na fase crônica da MCC há uma exacerbação do padrão Th1, que culmina com dano inflamatório direto ao tecido e modulação da expressão gênica do cardiomiócito (Ferreira et al., 2014). Já foi demonstrado que pacientes chagásicos crônicos com disfunção ventricular esquerda têm duas vezes mais níveis de TNF- $\alpha$  do que pacientes sem disfunção ventricular (Ferreira et al., 2003). Em nosso estudo, TNF- $\alpha$ , como descrito acima, foi o melhor marcador para diferenciar os grupos tratados e não tratados, sendo maior nos tratados, um achado surpreendente para nós.

IL-17 é produzida principalmente por células Th17, uma inovadora linhagem de células as quais sua descoberta levou à "quebra" do paradigma Th1-Th2 de dicotomia na produção de citocinas. Essa citocina tem propriedades pró-inflamatórias e induz fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e células epiteliais a produzirem mediadores inflamatórios, como GM-CSF, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de algumas quimiocinas, levando ao recrutamento de neutrófilos e inflamação (Nakae et al., 2003). Todavia, Santarlasci et al. (2012) propõem que as células Th17 possuem autocontrole na sua atuação, ao mostrarem que células Th17 humanas diferenciadas *in vitro* possuem uma capacidade reduzida de proliferação em resposta a estimulação do receptor de células T, e também apresentam déficit na produção de IL-2, fator de crescimento vital de células T, quando comparadas com outros padrões de diferenciação de células TCD4+. Deste modo, o padrão de resposta de células Th17 consegue controlar a resposta imune, diminuindo os danos aos tecidos do hospedeiro. Um estudo feito por Guedes et al. (2010) mostrou que IL-17 tem um importante papel de controlar a resposta inflamatória e a diferenciação Th1 em ratos infectados por *T. cruzi*. Não foram encontrados estudos que relacionassem níveis de IL-17 com tratamento prévio com

benznidazol. Nossos resultados mostram que o IL-17 foi o melhor marcador, juntamente com TNF- $\alpha$  para diferenciar os grupos tratados e não tratados, estando aumentado nos tratados. Considerando que IL-17 tenha um papel de controlar a resposta inflamatória e a diferenciação Th1, ela pode estar envolvida de alguma forma na ação do benznidazol, controlando inflamação, dano tecidual e progressão da doença. Entretanto, nossos resultados mostram também um maior padrão inflamatório Th1 para os tratados (aumento dos níveis circulantes de TNF- $\alpha$ , IL-12, CCL2, IL-1 $\beta$ ).

Revelli et al. (1999) demonstraram, num experimento usando ratos e análise *in vitro* de cultura de células, que o tratamento com benznidazol fez *down-regulation* na síntese de nitrito intracelular, IL-6, e em menor expressão IL-1 $\beta$  e IL-10. É conhecida a participação de IL-6 na geração de resposta mediada por linfócitos T e B, e pode ser pensada a sua participação primária na gênese da resposta de fase-aguda à injúria (Snick, 1990; Akira et al., 1993). Assim, os efeitos de bloqueio da produção de IL-6 induzidos pelo benznidazol podem ser importantes *in vivo* (Revelli et al., 1999). De fato, IL-6 era pensado por nosso grupo como uma importante citocina a ser analisada, com a hipótese que haveria importância na distinção dos grupos e, conseqüentemente, da resposta imune de cada grupo, sendo pior nos não tratados. Entretanto, nossos resultados não mostraram nenhuma diferença entre os grupos quanto aos níveis circulantes de IL-6. A análise da literatura mostra um papel semelhante do benznidazol na inibição da produção IL-1 $\beta$  (Revelli et al., 1999). De fato, IL-1 $\beta$  é uma citocina produzida primariamente por monócitos e macrófagos ativados que exerce múltiplos efeitos biológicos como atividade pró-inflamatória e regulação da resposta do hospedeiro para infecção (Dinarello, 1996; Arend 1993). Porém, nossos resultados mostram um aumento dos níveis circulantes de IL-1 $\beta$  nos pacientes tratados com benznidazol, em comparação com os não tratados, com diferença estatisticamente significativa. Apesar de descrição de *down-regulation* pelo benznidazol na produção de IL-10 descrita por Revelli et al. (1999), nossos achados não mostraram diferenças estatisticamente significativa entre os grupos tratados e não tratados.

Existem poucos estudos que investigaram e encontraram uma associação entre concentração plasmática de quimiocinas e o grau de função cardíaca em pacientes com diversas patologias (Filippatos et al, 2003; Parissis et al., 2002, Aukrust et al., 1998; Lehmann et al., 1998). Nesses estudos, CCL2 e CCL4 são mostrados como associados a uma disfunção cardíaca e seus níveis parecem normalizar depois do tratamento de

insuficiência cardíaca. Algumas quimiocinas, a dizer CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 e CCR5, estão envolvidas na estimulação da produção de IFN- $\gamma$  por células T específicas para *T. cruzi* e TNF- $\alpha$  por macrófagos e consequente migração de leucócitos para o local da inflamação (Kroll-Palhares et al., 2008). Talvani et al. (2004) demonstraram que CCL2, assim como TNF- $\alpha$  são marcadores não só de disfunção cardíaca, mas também da inflamação existente no miocárdio do paciente chagásico. Não foram encontrados estudos que investigassem diferenças nessas quimiocinas a partir do tratamento com benznidazol, mas o esperado seria uma diminuição dos níveis circulantes, juntamente com todo o padrão pró-inflamatório da MCC, como descrito acima. Entretanto, nosso estudo encontrou maiores níveis circulantes das quimiocinas CCL2 e CCL4 nos pacientes tratados, em relação aos não tratados.

*Granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) é descrito como uma citocina que sinaliza a proliferação de cardiomiócitos durante o desenvolvimento (Shimoji et al., 2010), além da mobilização e diferenciação de células tronco pós-natal da medula óssea em modelos de ratos com dano no miocárdio (Srinivas et al., 2009). Além disso, G-CSF foi demonstrado em proteger o tecido cardíaco de atrofia do cardiomiócito, fibrose e infiltração de células inflamatórias em modelos experimentais de miocardiopatia induzida por drogas (Li et al., 2007). Nesse sentido, G-CSF é conhecido por modular a produção de citocinas, aumentando IL-4 e IL-10 e diminuindo IFN- $\gamma$  (Pan et al., 1995), regulando a resposta imune à infecção por *T. cruzi*. Em nosso estudo, G-CSF foi encontrado em maiores níveis nos pacientes tratados, em relação aos não tratados, indo em concordância com o descrito na literatura. IL-4, que tem sua produção estimulada por G-CSF como descrito anteriormente, também teve níveis aumentados nos pacientes tratados. Além disso, um interessante estudo recente feito por González et al. (2013) demonstrou que G-CSF tem um efeito positivo na redução do dano cardíaco, quando administrado após um tratamento com benznidazol, sendo uma opção terapêutica de combinação de drogas, uma modulando a regeneração cardíaca e a outra reduzindo a carga parasitária de *T. cruzi*. Entretanto, esse estudo obteve resultados *in vitro* utilizando ratos e tratamento antiparasitário na fase aguda da infecção, o que necessita de investigação posterior para aplicação em humanos e na fase crônica.

A despeito dos resultados contraditórios em alguns aspectos nos resultados do padrão inflamatório por análise das citocinas circulantes, a função cardíaca dos pacientes deve ser levada em consideração. Nosso grupo, em trabalho analisando

parâmetros ecocardiográficos deste mesmo grupo de pacientes, encontrou melhor função cardíaca sistólica no grupo de pacientes tratados (Lessa, 2014). Isto vai de acordo com o estudo feito por Viotti et al. (2006), em que o tratamento com benznidazol foi associado com menor progressão da doença nos parâmetros ecocardiográficos. De fato, dispneia foi maior nos não tratados, ao passo que a frequência de classe funcional I do NYHA foi maior nos tratados, demonstrando uma tendência a melhor situação clínica entre os tratados.

O presente estudo apresenta algumas limitações. Primeiramente, o tempo entre o tratamento e a coleta da amostra sanguínea. Em segundo lugar, há uma diferença estatisticamente significativa entre a duração da doença entre os dois grupos, sendo essa maior nos não tratados, de forma que essa variável é um fator confundidor no estudo. Além disso, por ser um estudo de corte transversal, não há medidas seriadas dos parâmetros de citocinas utilizados, para eliminar possíveis vieses.

## VII. CONCLUSÕES

1. Os resultados desse estudo mostraram uma expressão média de citocinas mais alta em pacientes tratados do que nos não tratados com benznidazol, diferindo do que vem sendo descrito na literatura em relação ao padrão de resposta inflamatória. As citocinas com níveis mais elevados nos pacientes tratados foram: IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-12p70, IL-17, TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL4 e G-CSF, sendo esperado o contrário principalmente nas citocinas notadamente pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-12, CCL2, CCL4 e IL-1 $\beta$ ).

2. TNF- $\alpha$  e IL-17 foram os melhores marcadores pra diferir os grupos de tratados e não tratados com benznidazol. TNF-  $\alpha$ , um importante mediador e marcador de atividade pró-inflamatória e provavelmente envolvida na manutenção da miocardite crônica, esteve maior nos pacientes tratados com benznidazol. IL-17, um modulador da resposta inflamatória Th1, também esteve maior nos pacientes tratados.

3. Por outro lado, G-CSF e IL-4, que são protetores do cardiomiócito, também estiveram aumentados nos pacientes tratados em nossos resultados em relação aos não tratados. Deste modo, o tratamento pode levar a aumento de moléculas protetoras do cardiomiócito e ser benéfico aos pacientes. Além disso, G-CSF vem sendo estudado como um possível alvo terapêutico nos pacientes com miocardiopatia, o que necessita de maiores investigações.

4. O atual estudo tem sua importância destacada por abordar uma doença que, apesar de muito prevalente na América Latina, é ainda relativamente negligenciada em termos de saúde pública e com pouca investigação científica acerca dos mecanismos imunes envolvidos para buscar novos alvos terapêuticos sobre a causa fisiopatológica da doença de Chagas.

5. Os resultados do estudo necessitam de investigações posteriores através de estudos prospectivos para avaliar de modo adequado o impacto do tratamento com benznidazol sobre o padrão de resposta inflamatória, evolução dos pacientes e sua associação com desfechos clínicos importantes.

## VIII. SUMMARY

**TITLE: Inflammatory cytokines in Chagasic Miocardiopathy, according to previous treatment with benznidazole**

**INTRODUCTION:** Chagas disease has high prevalence in latin-american countries, mainly in Brazil, which presents important endemic zones in Bahia, where represents a severe public health problem. The Chagasic Miocardiopathy (MCC) has an inflammatory nature, whtih relevant production of pro-inflammatory cytokines from Th1 pattern and chemokines. Occurs in about 30% of infected patients by protozoan abou 5 to 30 years after infection, with high risk to progress to Cardiac Insufficiency and death. The factors that determine the composition of inflammatory infiltrate and contribute to migration and accumulation of inflammatory cells inside cardiac tissue in MCC are yet undiscovered. **OBJECTIVES:** to investigate the association of the levels of pro-inflammatory cytokines with evolutive stage of cardiopathy in MCC patients, relating with or without benznidazole treatment. **METHODS:** cross-sectional study with chagasic patients. Blood samples of patients were used for laboratory analysis of circulating levels of several pro-inflammatory cytokines. Statistic tests were used for analysis of data obtained and the patients were stratified in two groups: treated and non-treated with benznidazole. **RESULTS:** in hierarchical cluster analysis, the average expression of cytokines/chemokines of non treated group tended to be lower. Elevated levels of many immune markers were associated to treated group, in multinominal regression analysis, with statistically significant difference of some of them. Interleukin-17 (IL-17) and Tumoral Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) were the best markers to distinguish individuals with or without previous treatment with benznidazole. **CONCLUSIONS:** the cytokines expression was higher in benznidazole treated patients, surprisingly some of them pro-inflammatory, mainly TNF- $\alpha$ , but also some inflammatory activity modulator ones, as IL-17 and IL-4. The present study becomes relevant by being about a neglected in terms of public health with few scientific investigation about novel therapeutic targets to prevent Chagas disease progression.

**Keywords:** 1. Chagas disease; 2. Cytokines; 3. Nitromidazoles.



## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abel LC, Rizzo LV, Ianni B, Albuquerque F, Bacal F, Carrara D, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Autoimmun.* 2001;17(1):99-107
2. Abad-Franch F, Diotaiuti L, Gurgel-Gonçalves R, Gürtler RE. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013 Apr;108(2):251-4
3. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* 1993; 54:1-78.
4. Andrade ZA, Andrade S. A patologia da doença de Chagas. *Bol Fund Gonçalo Muniz.* 1955;6:1-52.
5. Andrade ZA, Sadirgursky M. Tromboembolismo em chagásicos sem insuficiência cardíaca. *Gaz Med Bahia.* 1971; 71:59-64.
6. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol.* 1993; 54:167-227.
7. Aukrust P, Ueland T, Muller F, Andreassen AK, Nordoy I, Aas H, et al. Elevated circulating levels of CC chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1998; 97:1136-43.
8. Bustamante JM, Bixby LM, Tarleton RL: Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8+ T central memory response in chronic Chagas disease. *Nat Med.* 2008; 14:542-550.
9. Braunwald E. Biomarkers in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 15:2148-59.
10. Camandaroba EL, Reis EA, Gonçalves MS, Reis MG, Andrade SG: *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from highly resistant Colombian strain. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36:201-9.

11. Câmara, EJM. Deficiência de magnésio intracelular na miocardiopatia crônica chagásica descompensada. Importância em arritmias cardíacas e toxicidade digitálica. *Arq Bras Cardiol.* 1983; 41:174.
12. Câmara EJM. Alterações Segmentares da Contratilidade do Ventrículo Esquerdo na Cardiopatia Chagásica Com e Sem Dilatação Ventricular. *Arq Bras Cardiol.* 1993; 60(3):151-5.
13. Camargo ME, Silva, GR, Castilho EA, Silveira, AC. Inquérito sorológico de prevalência de infecção chagásica no Brasil - 1975/1980. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 1984; 26:192-204.
14. Cançado JR: Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop.* 2002; 44:29-37.
15. Chessler AD, Unnikrishnan M, Bei, AK, Daily JP. and Burleigh, BA. Trypanosoma cruzi triggers an early type I IFN response in vivo at the site of intradermal infection. *Immunol.* 2009; 182:2288-96.
16. Coura JR. Perspectivas actuales del tratamiento específico de La enfermedad de Chagas. *Bol Chil Parasitol.* 1996; 51:69-75.
17. Coura JR, Abreu LL, Willcox HPF, Petana W. Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo in the chronic form of Chagas disease in a field area with interrupted transmission. I - Preliminar evaluation. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997; 30:139-44.
18. Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011; 106(6): 641-5.
19. Coura JR, Brindeiro PJ, Ferreira I. Benznidazole in the treatment of Chagas disease. Current chemotherapy. *Proc 10th Int Cong Chemotherapy.* 1978; 1:161-2.
20. D'avila Reis D, Jones EM, Tostes Jr S, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, Mc Curley TL. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic

- myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- $\alpha$  cells and dominance of granzyme A $^{+}$ , CD8 $^{+}$  lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 48: 637-44.
21. Diaz de Taranzo EG, Castro JA, Frank de Cazzulo JJ. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, protein and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia.* 1988; 44: 880-1.
  22. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 87:2095-147.
  23. Dosreis GA, Lopes MF The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:259-62.
  24. Espinosa R, Carrasco HÁ, Belandria F, Fuenmayor AM, Molina C, Gonzalez R, Martinez O. Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973-1983). *Int J Cardiol.* 1985; 8:45-56.
  25. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2003; 98(3):407-11.
  26. Ferreira LRP, Frade AF, Baron MA, Navarro IC, Kalil J, Chevillard C, Cunha-Neto E. Interferon- $\gamma$  and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. *World J Cardiol.* 2014 August 26; 6(8): 782-90.
  27. Filippatos G, Parissis JT, Adamopoulos S, Kardaras F. Chemokines in cardiovascular remodeling: clinical and therapeutic implications. *Curr Mol Med.* 2003; 3:139-47.
  28. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, De Mello, FG, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 2000; 403:199-203.
  29. Freire-de-Lima CG, Xiao YQ, Gardai SJ, Bratton DL, Schiemann WP, Henson PM. Apoptotic cells, through transforming growth factor- $\beta$ , coordinately

- induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *Biol Chem.* 2006; 281(50):38376-84
30. Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:1521-28.
  31. González MN, Dey N, Garg NJ, Ponstan M. Granulocyte colony-stimulating factor partially repairs the damage provoked by *Trypanosoma cruzi* in murine myocardium. *Int J Cardiol.* 2013; 168(3): 2567–74.
  32. Guedes PMM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, Silva JS. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e604
  33. Higuchi ML, de Moraes CF, Pereira-Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G et al. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol.* 1987; 10:665-70.
  34. Higuchi ML, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Archiv A Pathol Anat.* 1993; 423:157-60.
  35. Kroll-Palhares K, Silvério JC, Silva AA, Michailowsky V, Marino AP, Silva NM, et al. 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.* 2008;103:375-385.
  36. Lehmann MH, Kuhnert H, Muller S, Sigusch HH. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) gene expression in dilated cardiomyopathy. *Cytokine.* 1998; 10:739-46.

37. Lessa, RA. Comparação dos parâmetros do Doppler tecidual do anel mitral e tricúspide em diferentes estágios da cardiopatia chagásica. Monografia de Conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia/Universidade Federal da Bahia, 2014.
38. Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, et al. Granulocyte colony-stimulating factor improves left ventricular function of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Lab Invest.* 2007; 87:440–55.
39. Lopez L, Arai K, Gimenez E, Jimenez M, Pascuzo C, Rodriguez-Bonfante C, Bonfante-Cabarcas R. C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure. *Rev Esp Cardiol.* 2006; 59:50-6.
40. Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol. Res.* 2010; 43(3):323-31.
41. Milei J, Storino R, Fernandez Alonso G, Beilgeman R, Vanzulli S, Ferrans VJ. Endomyocardial biopsies in chronic chagasic cardiomyopathy. Immunohistochemical and ultrastructural findings. *Cardiology.* 1992; 80(5-6):424-37.
42. Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2003; 98(5):577-91.
43. Mota EA, Guimarães AC, Santana O, Sherlock I, Hoff R, Weller TH. A nine-year prospective study of Chagas' disease in a defined rural population in NE Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 42:429-40
44. Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M. Diagnosis and treatment of Chagas disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(Supl 1):26–34.
45. Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, et al. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive

- arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:5986–90
46. Pan L, Delmonte J, Jr, Jalonen CK, Ferrara JL. Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood*. 1995; 86:4422–9.
  47. Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou KF, Mentzikof DG, Karas SM, Kremastinos DT. Serum profiles of C-C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling. *J Interferon Cytokine Res*. 2002; 22:223-9.
  48. Piaggio E, Roggero E, Pitashny M, Wietzerbin J, Bottasso OA, Revelli SS. Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Parasitol Res*. 2001; 87:539-47
  49. Polak A, Riehle R. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Ann Trop Med Parasitol*. 1978; 72:228-32.
  50. Pompilio MA, Paniago AMM, Borges-Pereira J, Silva FAD, Silva RCB, Lima JHF. Análise clínica-epidemiológica de 200 casos de doença de Chagas atendidos no HU-UFMS de 1986-1996. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31(supl I):214.
  51. Rassi Jr. A, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, et al. Development and Validation of a Risk Score for Predicting Death in Chagas' Heart Disease. *N Engl J Med*. 2006; 355:799-808.
  52. Rassi Jr. A, Rassi A, Rassi SG. Predictors of Mortality in Chronic Chagas Disease A Systematic Review of Observational Studies. *Circulation*. 2007; 115:1101-8.
  53. Revelli S, Le Page C, Piaggio E, Wietzerbin J, Bottasso O. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol* 1999; 118:271-7.

54. Ribeiro M, Pereira-Chioccola VL, Renia L, Augusto Fragata Filho A, Schenkman S, Rodrigues MM. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Parasite Immunol.* 2000; 22(1):49-53.
55. Ribeiro AL, Rocha MO. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998; 31(3):301-14.
56. Rossi MA. Patterns of myocardial fibrosis in idiopathic cardiomyopathies and chronic Chagasic cardiopathy. *Can J Cardiol.* 1991; 7(7):287-94.
57. Ropert C, Ferreira LRP, Campos MAS, Procópio DO, Travassos LR, Ferguson MAJ, et al. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Microbes Infect.* 2002; 4: 1015-25.
58. Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Querci V, Beltrame L, Cavalieri D, et al. Rarity of human T helper 17 cells is due to retinoic acid orphan receptor–dependent mechanisms that limit their expansion. *Immunity.* 2012; 36:201–14.
59. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, Borges JD, Lana M, Teixeira-Carvalho A, et al. Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scand J Immunol.* 2006; 64:554-63.
60. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, De Lana M, Pinto Dias JC, Teixeira-Carvalho A, et al. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes Infect.* 2008; 10:103-13.
61. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, and Martins-Filho AO. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104:246-51.

62. Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Elói-Santos SM, Gontijo ED, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO. Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with trypanosoma cruzi antigens. *BMC Infectious Diseases*. 2012;12:123
63. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of chagas disease control. *Trends Parasitol*. 2006; 22(12):583-8.
64. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Revista Soc Bras Med Trop*. 2005; 38:1-29.
65. Silva JS, Machado FS, Martins GA. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci*. 2003; 8: S314-25.
66. Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori F, Tanaka T, Hara M, et al. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell*. 2010; 6:227–37.
67. Snick J. Interleukin-6: an overview. *Ann Rev Immunol*. 1990; 8:253-78.
68. Srinivas G, Anversa P, Frishman WH. Cytokines and myocardial regeneration: a novel treatment option for acute myocardial infarction. *Cardiol Rev*. 2009; 17:1–9.
69. 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
70. Toledo MJ, Bahia MT, Veloso VM, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Alves CF, et al. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different Trypanosoma cruzi clonal genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53:1045-53.
71. Une C, Andersson J, Orn A. Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with Trypanosoma cruzi. *Clin Exp Immunol*. 2003; 134:195-201.



72. Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendonza L, Fuentes AM, Anastagasti MJ, Martin J, et al. IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97(2):734-9.
73. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. 2006; 144:724-34.
74. Wendel S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Current opinion in hematology*. 1998; 5(6):406-11.

## X. ANEXOS

### ANEXO I:

<u>FICHA CLÍNICA</u>				Prontuário	
<b>1 Grupo de entrada no estudo</b>	0	I	II	III	DATA:
0 ECG normal (indeterminada)	<b>2 Tratamento específico</b>				CÓDIGO:
I ECG anormal Rx e Eco normais	Sim	Não			Preenchido por:
II ECG anormal Rx e/ou Eco anormais, sem IC	Completo	dias	Quando?		
III Insuficiência cardíaca	Incompleto	dias			

Endereço:

Telefone/E-mail:

Data de nascimento:

3 Idade

4 Sexo: [1]Masc [2]Fem

5 Naturalidade: [1]Salvador [2]interior da Bahia [3]outro estado

7 Escolaridade/profissão:

6 Raça/Etnia: [1]negro [2]mulato/moreno [3]branco

8 Tempo do diagnóstico da D. de Chagas

#### Anamnese/Exame Físico

9 Classe Funcional(NYHA): [ ]I [ ]II [ ]III [ ]IV

10 Dispnéia de esforço: [1]sim [2]não

11 Síncope(e/ou pré-síncope): [1]sim [2]não

12 Palpitação:[1]sim [2]não

13 Edema MMII: [1]sim [2]não

14 PAS(mmHg):

15 PAD(mmHg):

16 PR(bpm):

#### Morbidades

17 HAS: [1]sim [2]não

18 DAC: [1]sim [2]não

19 DM: [1]sim [2]não

20 AVE prévio: [1]sim [2]não

#### Exames Complementares

Sorologia Chagas: [ ]hemaglutinação [ ]ELISA [ ]fix.complemento [ ]imunofluorescência [ ]não realizado

#### ECG

21 Ritmo: [1]sinusal [2]fibrilação/flutter atrial [3]outros: \_\_\_\_\_

\_\_/\_/\_\_\_

22 FC(bpm):

23 Sobrecarga de câmaras: [1]sim [2]não

24 Extrassístoles supraventriculares: [1]sim [2]não

25 Extrassístoles ventriculares: [1]sim [2]não

26 BAV: [1]1ºgrau [2]2ºgrau, Mobitz 1 [3]2ºgrau, Mobitz 2 [4]3ºgrau [5]não

27 BRD: [1]sim, incompleto [2]sim, completo [3]não

28 BRE: [1]sim, incompleto [2]sim, completo [3]não

29 HBAE: [1]sim [2]não

30 HBPE: [1]sim [2]não

31 Alteração de repolarização ventricular: [1]sim [2]não

#### RX tórax

44 Área cardíaca: [1]aumentada

\_\_/\_/\_\_\_

[2]normal

45 Cefalização vasos pulmonares: [1]sim

[2]não

#### OBS.:

ANEXO II:

**Iniciais:** .....

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

É importante que você leia com atenção as informações abaixo. Esta folha contém informações sobre como informações a respeito de sua doença serão publicados na literatura. O responsável pelo estudo discutirá com você e responderá a qualquer dúvida que você possa ter. Sua participação no estudo é voluntária e você está livre para retirar-se do mesmo a qualquer momento.

**Estudo:** Citocinas Inflamatórias e Associação com Progressão da Miocardiopatia Chagásica

**Instituição:** Hospital Universitário Prof. Edgard Santos

**Endereço:** Rua Joao das Botas s/n, Canela , 40110-160, Salvador-Bahia-Brasil.

**Investigador Responsável:** Dr. Edmundo José Nassri Câmara

**Tel:** (71) 8872-8585 (71) 3283-8863

**Co- Investigador:**

Dra. Adriana Lopes Latado Braga Tel: (71) 8845-8662

**Convite e Objetivo:**

Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo analisar o papel de marcadores inflamatórios como preditores de progressão da cardiopatia chagásica. Você está sendo convidado porque você tem cardiopatia chagásica ou então você é um individuo sadio e os seus exames de sangue servirão como base da variação normal em nossa população. O objetivo é ver se pessoas com esta doença tem uma resposta diferente de pessoas sem a doença (avaliar a influência da resposta imune na evolução). Para avaliar o seu sistema imune, temos que retirar 15ml de seu sangue. Além disso, nós vamos aplicar um questionário. Após explicar a você o que contém este questionário, você pode perguntar tudo sobre o estudo a seu medico. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este formulário de consentimento. O trabalho apenas divulgará para a comunidade médica algumas características do seu caso. Nenhuma imagem ou informação sua será divulgada de modo a permitir sua identificação.

**Possíveis riscos:**

A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e, raramente, pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. Se houver complicações da coleta de sangue (muito raro), você terá toda a assistência médica necessária no Hospital Universitario Prof. Edgard Santos em Salvador para resolver a situação.

**Possíveis benefícios:**

A participação no estudo não mudará o tratamento de sua doença. Apenas divulgaremos para comunidade médica para que os médicos conheçam melhor como se comporta esta doença.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) desta instituição em 25/08/10. Sua realização está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Saúde que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

**Participação Voluntária:**

A participação do paciente neste estudo é voluntária. A decisão de não participar ou de se retirar do estudo depois do mesmo já ter iniciado, não ocasionará nenhum problema. Sua recusa em participar do estudo ou sua desistência em continuar não afetará, de modo algum, o tratamento que você está recebendo.

**Procedimentos:**

Caso você aceite participar do estudo, um questionário será aplicado para saber onde você mora, sua ocupação, seus hábitos, a história da sua doença. Um médico examinará você para ver se existe alteração cardíaca, e, se tiver, poder lhe orientar. Também, um médico vai pedir para ver seus exames de laboratório, eletrocardiograma e radiografia de tórax, ou outros quando necessários. Se você concordar em retirar sangue para o estudo, 15ml de sangue serão colhidos (equivalente a 1 colher de sopa) por um profissional capacitado, usando seringas e agulhas descartáveis. Se você concordar, estes exames serão repetidos ao final de cada ano de seguimento, juntamente com os seus exames de rotina.

**Confiabilidade:**

Toda informação obtida de sua participação neste estudo será tratada de forma estritamente confidencial, ficando sua identidade mantida em sigilo, sendo de conhecimento apenas dos investigadores do estudo.

O Comitê de Ética do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos é um órgão que defende a proteção de seres humanos de procedimentos ou pesquisas inadequadas. Portanto, a nossa pesquisa foi aprovada e você pode confiar.

**Custos:**

Você não terá custos com a participação no estudo e, caso necessite ajuda por causa de complicação de coleta de sangue, esta lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

**Esclarecimentos**

Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Edmundo Camara (Tel—71-8872-8585).

**Consentimento**

Se você leu o consentimento informado, ou este lhe foi explicado, e você concorda em participar do estudo, favor assinar seu nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue.

**ACEITO. Vou participar no estudo e aceito que a amostra seja armazenada para uso exclusivo de pesquisa em doença de Chagas.**

**Não ACEITO. Não vou participar no estudo.**

---

Assinatura ou impressão digital do participante

Data

---

Nome e assinatura do pesquisador

Data

---

Nome e assinatura da testemunha

Data

## Parecer Consubstanciado de Projeto

Título do Projeto: Proteína C reativa e Citocinas Séricas como Marcadores de Progressão da Cardiopatia Chagásica sem Insuficiência Cardíaca (estágios evolutivos I e II): Correlação com a Função Ventricular Analisada pelo Ecocardiograma BI-dimensional com Doppler tecidual.

Pesquisador Responsável : Edmundo José Nassri Câmara.

Data da Versão 01/09/2010

Cadastro 77/10

Data do Parecer 02/02/2011

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

## Objetivos do Projeto

Investigar a associação dos níveis de PCR e de citocinas (IL-6, TNF- $\alpha$ ) com a progressão da cardiopatia em pacientes nos estágios evolutivos I e II (sem insuficiência cardíaca).

## Sumário do Projeto

A doença de Chagas representa um importante problema de saúde pública na América Latina. Mundialmente, estima-se que 18 milhões de pessoas encontram-se cronicamente infectadas pelo T. cruzi e que ocorrem aproximadamente 200.000 novos casos a cada ano.

Sabe-se que as alterações eletrocardiográficas, a dilatação de câmaras cardíacas, as alterações da contratilidade segmentares ou globais e as arritmias ventriculares são índices de pior prognóstico para IC e morte (Viotti R 2006; Rassi Jr A et al. 2006, 2007). Alterações ainda mais precoces da função ventricular podem ser detectadas com técnicas mais modernas como o Doppler tecidual, o strain e o strain rate (Silva CES et al. 2005). Porém não existem estudos prospectivos aplicando estas novas técnicas numa fase inicial da doença de Chagas com seguimento longitudinal a médio-longo prazo.

A inflamação tem importante papel na patogênese e na progressão de muitas formas de IC (Braunwald E 2008), e na miocardite crônica chagásica é ainda mais evidente. Marcadores da inflamação, como as citocinas pró-inflamatórias (interleucinas 1, 6 e 18, e o TNF- $\alpha$ ), bem como a proteína-C reativa, têm sido descritos como alterados na IC, bem como úteis na estratificação e na identificação de indivíduos assintomáticos com risco de desenvolver IC. Alguns marcadores de inflamação como a proteína C reativa (PCR) e a interleucina 6 (IL6) parecem estar relacionados com a progressão e com as fases mais avançadas da cardiopatia chagásica (Lopez L et al. 2006).

População de estudo: indivíduos com idade < 50 anos e pelo menos 2 testes sorológicos positivos para Chagas (fixação de complemento, hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta ou ELISA), sem sinais de IC.

Os pacientes serão provenientes dos Ambulatórios de Cardiologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, de bancos de sangue da cidade de Salvador e de uma cidade do interior bahiano (Itaberaba) onde dispomos de uma clínica de referência, com um número aproximado de atendimento de 50 pacientes chagásicos/mês, muitos na fase inicial da doença.

Tipo de estudo e n amostral: estudo do tipo coorte prospectiva. N amostral estimado de 150 pacientes chagásicos baseando-se num risco relativo de 4 para progressão da doença dos indivíduos com níveis elevados dos marcadores inflamatórios e/ou com alteração ao Eco-Doppler tecidual, respectivamente, alfa de 0,05 e poder do estudo de 80% (vide anexo). Serão estudados 30 adultos não chagásicos saudáveis, com idade < 50 anos, para controle normal dos parâmetros ecocardiográficos e dos marcadores inflamatórios.

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	
Tipo de projeto	Pesquisa em Seres Humanos
Delimitação	Adequado
Tamanho de amostra	Total Na Instituição
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Adequado
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Não
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Não
Referências Bibliográficas	Adequadas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

**Projeto aprovado**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

• O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.


• O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do

pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ e ao término do estudo.

Para projetos do Grupo 1 do fluxograma acrescentar:

Seu projeto (Registro\_\_\_\_ Grupo\_\_\_\_ Área temática especial\_\_\_\_) está sendo encaminhado a CONEP e só poderá ser iniciado após parecer aprovatório desta.

  
ROBERTO BADARÓ, MD PHD  
Coordenador CEP  
CHUPES

### SISNEP - Sistema Nacional de Ética em Pesquisa

 Andamento do projeto - CAAE - 0057.0.442.000-10 

**Título do Projeto de Pesquisa**  
Proteína C reativa e Citocinas Séricas como Marcadores de Progressão da Cardiopatia Chagásica sem Insuficiência Cardíaca (estágios evolutivos I e II): Correlação com a Função Ventricular Analisada pelo Ecocardiograma Bi-dimensional com Doppler tecidual

Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	01/09/2010 14:10:23	21/03/2011 10:29:38		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	01/09/2010 14:10:23	Folha de Rosto	0057.0.442.000-10	CEP
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	25/08/2010 16:01:46	Folha de Rosto	FR366338	Pesquisador
3 - Protocolo Aprovado no CEP	21/03/2011 10:29:38	Folha de Rosto	77/2010	CEP

 Voltar