

Silvia Marinho Martins Alves

Associação entre os polimorfismos do fator de necrose tumoral e da enzima conversora de angiotensina com a apresentação clínica na doença de Chagas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Felix José Alvarez Ramires

Coorientadora: Dra. Joseli Lannes-Vieira

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Alves, Silvia Marinho Martins

Associação entre os polimorfismos do fator de necrose tumoral e da enzima conversora de angiotensina com a apresentação clínica na doença de Chagas / Silvia Marinho Martins Alves. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: Félix José Alvarez Ramires.

Coorientadora: Joseli Lannes-Vieira.

Descritores: 1.Doença de Chagas/genética 2.Doença de Chagas/complicações
3.Cardiomiotopia chagásica 4.Polimorfismo genético 5.Biomarcadores 6.Doenças negligenciadas

USP/FM/DBD-363/15

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Águeda e Armando Martins. A minha mãe, pelo exemplo dado e por tanto estímulo para prosseguir nesta caminhada, apesar de tantos obstáculos; a meu pai, de onde estiver, por iluminar meu caminho.

Aos meus filhos, Maria Paula e Luís Eduardo, por terem me dado a oportunidade de desempenhar o maior papel da vida, ser mãe. A meu marido e filhos, por compreenderem que o tempo subtraído da convivência pretende contribuir efetivamente para o desenvolvimento científico e, principalmente, da saúde da população dos portadores da doença de Chagas.

Às minhas irmãs e sobrinhos pelo apoio incondicional e pela rica convivência.

Ao meu mestre Wilson Oliveira, lembrando-me sempre do seu olhar de respeito à figura humana.

AGRADECIMENTOS

A Félix José Alvarez Ramires, meu orientador que, apesar da distância, se manteve sempre presente, com grande compreensão e incentivo, conduzindo, com rara gentileza, todas as fases do doutorado. À equipe de profissionais da Unidade Clínica de Miocardiopatias do Instituto do Coração – HC-FMUSP, pelo acolhimento e apoio e, de forma especial a Lucia Oliveira pela efetiva colaboração e ao Diretor Prof. Charles Mady.

A Joseli Lannes-Vieira, por sua disponibilidade sem limites, perspicazes comentários e sugestões em todas as fases da pesquisa, seu desejo de contribuir com o meu crescimento científico, como também dos que compõem o ambulatório de doença de Chagas – Procape, que me sirvam de exemplo. Agradeço, ainda, a todos que fazem o laboratório das interações – FioCRUZ - RJ.

Em memória a Valdinete Paiva, por ter me feito aceitar o desafio, expressando palavras de otimismo.

A Lúcia Elena, pela incomensurável colaboração na execução de todo o estudo genético e imunológico e por suas estimulantes discussões e sugestões que enriqueceram esta tese, assim como a recepção no laboratório de Hansen – FIOCRUZ - RJ, especialmente a Dr. Milton Moraes.

A Cristina Carrazone, pelo apoio incondicional que possibilitou a admissão e finalização do doutorado.

A Carolina Medeiros e Camila Sarteschi, por terem sido incansáveis em todas as minhas solicitações de ajuda, amigas preciosas.

Aos membros do ambulatório de doença de Chagas, especialmente a Dra. Lúcia Costa, Dra. Maria da Glória Melo e Cristina Tavares, pela colaboração e amizade e aos colaboradores Aucieneide Braga, Lúcia e Damares.

Aos voluntários da associação de pacientes portadores de doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca, pela dedicação e apoio, extensivos a todos os pacientes que participaram e tornaram possível a execução deste projeto.

A todos os colegas da FIOCRUZ – PE, especialmente a Virgínia Lorena, Suelen Braz e Adriene Melo, pela contribuição.

Ao Dr. Sílvio Paffer, à Profa. Fernanda Pantoja e aos demais coordenadores da Secretaria de Saúde da Prefeitura da Cidade do Recife, pela rara sensibilidade e incentivo à formação acadêmica.

Aos diretores médicos, especialmente do Setor de Ecocardiografia, enfermeiros, biomédicos e auxiliares de enfermagem do PROCAPE, pelo compromisso e empenho durante o desenvolvimento do projeto.

À Coordenação de Pós-Graduação em Cardiologia por tantas solicitações atendidas com grande presteza.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia	2
1.2	Formas clínicas.....	6
1.3	Patogenia	8
1.4	Genética	11
2	OBJETIVOS	15
2.1	Geral.....	16
2.2	Específicos	16
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	17
3.1	Casuística.....	18
3.2	Critérios de inclusão	19
3.3	Critérios de exclusão	20
3.4	População estudada.....	21
3.5	Fluxo do estudo	23
3.5.1	Avaliação clínica/complementar	25
3.5.2	Dosagens sanguíneas	25
3.5.3	Extração de DNA.....	26
3.5.4	Genotipagem	27
3.5.5	Quantificação dos níveis séricos de citocina TNF	29
3.6	Análise estatística.....	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Características da população em estudo.....	33
4.2	Genotipagem: perfil e comparação quanto aos grupos analisados ...	36
4.3	Análise de concentrações séricas de TNF: perfil e comparação quanto aos grupos analisados, fração de ejeção e uso de medicamentos	38
5	DISCUSSÃO	42
5.1	Marcadores genéticos	43
5.2	TNF como marcador inflamatório	55
5.3	Limitações	56
5.4	Considerações finais e implicações clínicas.....	56
6	CONCLUSÃO.....	58
7	REFERÊNCIAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Lista de abreviaturas

BB	betabloqueadores
BNP	peptídeo natriurético cerebral
BRA	bloqueadores dos receptores da angiotensina
CCC	cardiopatía chagásica crônica
CCL2	quimiocina quimioatratante de monócito-1
DCh	doença de Chagas
DD	deleção / deleção
ECA	enzima conversora da angiotensina
ECG	eletrocardiograma
FEVE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IC	insuficiência cardíaca
ID	inserção / deleção
IECA	inibidores da enzima de conversão da angiotensina
IFN γ	interferon-gama
II	inserção / inserção
IL	interleucina
MCP-1	quimiocina quimiotática de monócitos-1
NK	células <i>natural killer</i>
NO	óxido nítrico
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OR	<i>odds ratio</i>
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PCR	reação em cadeia da polimerase
PROCAPE	Pronto-Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco Prof. Luiz Tavares
RMR	região metropolitana do Recife
ROC	<i>receiver operator characteristic</i>
SNC	sistema nervoso central
SNPs	polimorfismo de nucleotídeo único
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science</i>
SRAA	sistema renina-angiotensina-aldosterona
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TGF β	fator transformador de crescimento beta
TLR	receptores do tipo <i>Toll</i>
TNF	fator de necrose tumoral
UPE	Universidade de Pernambuco
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo

Lista de símbolos

cm ³	centímetros cúbicos
g/dL	gramas por decilitro
kg	quilograma
m	metros
mEq/L	mEq por litro
mg%	miligrama por cento
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/L	miligramas por litro
mL	mililitros
mL/kg/min	mililitros por quilo por minuto
mL/min	mililitros por minuto
mL/min	mililitros por minuto
mm	milímetros
mmHg	milímetros de mercúrio
mol/L	mol por litro
ng/mL	nanogramas por mililitro
nm	nanômetros
nmol/L	nanomol por litro
°C/graus	Celsius
°C/min	graus Celsius por minuto
pg/mL	picogramas por mL
pmol/L	picomol por litro
r	correlação
r ²	quadrado
U/L	unidades por litro
x	<i>versus</i>
β	coeficiente beta
µg/kg/min	microgramas por quilo por minuto
µg/L	microgramas por litro
µL	microlitros
<	menor
>	maior
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual
±	mais ou menos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características gerais dos SNPs e ensaios de genotipagem correspondentes.....	29
Tabela 2	Características clínicas quanto aos grupos analisados.....	35
Tabela 3	Perfil do uso de medicamentos quanto aos grupos analisados...	35
Tabela 4	Distribuição dos genótipos do polimorfismo do TNF-308.....	36
Tabela 5	Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene da ECA I/D	36
Tabela 6	Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo do TNF-308, comparando pacientes do estágio A com o estágio C	37
Tabela 7	Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo da ECA, comparando pacientes do estágio A com o estágio C	37
Tabela 8	Características clínicas quanto aos grupos analisados da dosagem sérica do TNF	38
Tabela 9	Estudos desenvolvidos em DCh e polimorfismo TNF-308	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Doença de Chagas - número estimado de casos e <i>status</i> da transmissão vetorial	3
Figura 2	Classificação clínica da cardiopatia chagásica crônica	7
Figura 3	Modelo hipotético da ação do TNF no coração, sob condições fisiológicas e patológicas	10
Figura 4	Fases da interação hospedeiro-ambiente no decurso de uma infecção	11
Figura 5	Execução, seleção e coleta.....	23
Figura 6	Desenho do estudo	24
Figura 7	Espectrofotometria por Nanodrop.....	27
Figura 8	Gráfico de discriminação alélica do SNP TNF-308.....	28
Figura 9	Distribuição dos pacientes entre as regiões do estado de Pernambuco	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Níveis séricos de TNF de portadores de infecção pelo <i>T. cruzi</i> classificados em estágios A e C em comparação a controles não infectados	39
Gráfico 2	Níveis séricos de TNF de portadores de infecção pelo <i>T. cruzi</i> classificados em estágios A e C, estratificados por valores da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, em comparação a controles não infectados	40
Gráfico 3	Níveis séricos de TNF de portadores de infecção pelo <i>T. cruzi</i> classificados quanto à expressão dos genótipos GG e GA do polimorfismo TNF-308	41

RESUMO

Alves SMM. *Associação entre os polimorfismos do fator de necrose tumoral e da enzima conversora de angiotensina com a apresentação clínica na doença de Chagas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: A DCh (doença de Chagas) é uma doença negligenciada, com evolução para formas graves em 30% dos casos. No passado, era restrita à América Latina, entretanto, nas últimas décadas, o fenômeno migratório modificou o perfil epidemiológico, globalizando a doença. Inegáveis avanços aconteceram no Brasil, nas últimas décadas, mesmo assim, restam aproximadamente 3 milhões de pacientes. Desigualdades regionais são encontradas, com indicadores desfavoráveis na região Nordeste, relacionados não só ao predomínio de casos em crianças, identificados por avaliação sorológica, mas também pelo número de mortes relacionado à doença. Na fase crônica, amplo espectro de apresentações pode ser encontrado, variando desde a forma indeterminada, com favorável evolução, até pacientes com grave envolvimento cardíaco e alta mortalidade. Diante da apresentação heterogênea, a predição do risco de evolução e morte na DCH continua sendo um grande desafio. Maior ainda é a identificação de fatores determinantes, sobretudo do tipo de acometimento cardíaco. Assim, é possível que marcadores genéticos possam contribuir efetivamente, nesse cenário. O valor dos polimorfismos nos genes do fator de necrose tumoral (TNF) e da enzima conversora da angiotensina (ECA) na doença de Chagas é controverso. **Objetivo:** avaliar se os polimorfismos da I/D da ECA e do TNF-308 são marcadores de risco para a ocorrência de Insuficiência cardíaca na cardiopatia chagásica crônica (CCC), em população do Nordeste brasileiro. **Material e métodos:** realizado estudo tipo caso-controle. Foram analisados 201 pacientes portadores de *T. cruzi* + classificados em estágios, de acordo com a Diretriz Latino Americana para Cardiopatia Chagásica – Sociedade Brasileira de Cardiologia. Foram incluídos 99 pacientes em estágio C com presença de disfunção ventricular, definida por fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor que 50% e sintomas prévios ou atuais de IC e 102 em estágio A, pacientes assintomáticos, com eletrocardiograma e ecocardiograma normais. Foram excluídos portadores de manifestação digestiva. Analisaram-se os polimorfismos da I/D da ECA e do TNF-308. **Resultados:** o perfil geral da população estudada apresenta pacientes naturais de estados do Nordeste brasileiro, com 81,1% do estado de Pernambuco, com baixos indicadores de escolaridade (frequência à escola de até 4 anos: 52,7% e renda familiar de até 1 salário mínimo: 64,7%). Há predominância feminina (64%), com igualdade

entre grupos ($p=0,3$). Idade média de 55 anos, sendo mais jovens no estágio A (idade média: 51 anos) ($p=0,001$). A hipertensão arterial sistêmica esteve presente em 40% da população, com discreto predomínio entre pacientes do estágio C ($p=0,05$), e a Diabetes esteve presente em 8%, sem diferença entre os grupos ($p=0,5$). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo média do estágio C foi $38\pm 9\%$ e de $67\pm 5\%$ no estágio A. Na avaliação de associação entre os genótipos dos polimorfismos TNF-308 e I/D do gene da ECA e as distintas formas clínicas na DCh foi encontrada associação entre o genótipo II no polimorfismo da ECA e a permanência no estágio A. O padrão não permaneceu quando a avaliação do OR foi ajustada para sexo, idade e uso de benznidazol e também no estudo por alelos, evidenciando ausência de associação entre todos os polimorfismos estudados. **Conclusão:** os polimorfismos TNF-308 e I/D do gene da ECA pesquisados não se constituíram em marcadores de risco para o desenvolvimento de CCC grave.

Descritores: Doença de Chagas/genética. Doença de Chagas/complicações. Cardiomiopatia chagásica. Polimorfismo genético. Biomarcadores. Doenças negligenciadas.

ABSTRACT

Alves SMM. *Association between the polymorphisms of tumor necrosis factor and angiotensin converting enzyme with the clinical presentation in Chagas' disease* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Intoduction: Chagas disease (CD) is a neglected disease, with progression to severe forms in 30% of cases. In the past, it was restricted to Latin America. However, in recent decades, the phenomenon of migration has led to its epidemiological profile having changed and the disease is now a global one. Despite undeniable advances having taken place in Brazil in recent decades, there remain close to 3 million cases. Regional inequalities are found including unfavorable indicators in the Northeast which are not only about the predominance of cases in children, identified by serological evaluation, but also the number of deaths related to CD. In the chronic phase, a broad spectrum of presentations can be found, ranging from the indeterminate form, with favorable evolution, to patients with severe cardiac involvement and high mortality. Given the heterogeneous presentation, predictions on the risk of progression and death due to CD remain very challenging. Greater still is the identification of their determining factors, particularly as to the type of cardiac involvement. Thus, it is possible that genetic markers may contribute effectively, given this situation. The value of polymorphisms in the genes of the tumor necrosis factor (TNF), and of the angiotensin converting enzyme (ACE) in Chagas' disease is controversial. **Objective:** To assess whether the I/D polymorphisms of ACE and TNF-308 are risk factors for the occurrence of heart failure (HF) in chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), in the population of Northeast Brazil. **Materials and methods:** A case-control study was conducted. 201 patients with *T. cruzi* + classified in stages, in accordance with the Latin American guideline for Chagas cardiopathy - Brazilian Society of Cardiology, were analyzed. These included 99 patients in stage C (presence of ventricular dysfunction (defined as the ejection fraction of the left ventricle being less than 50%) and previous or current symptoms of HF and 102 patients in stage A (asymptomatic patients) whose electrocardiograms and echocardiograms were normal. Those with digestive manifestation were excluded. The I/D polymorphisms of ACE and TNF-308 were analyzed. **Results:** The general profile of the population studied presents patients from states in the Northeast of Brazil of whom 81.6% are from the State of Pernambuco, and whose education indicators are low (4 years of elementary schooling: 52.7%) and whose family income is up to 1 minimum wage: 64.7%. Females predominate (64%), with equality between groups ($p=0.3$). Average age is 55 years and younger in Stage A (mean age: 51 years) ($p=0.001$).

Systemic arterial hypertension was present in 40% of the population, with a slight predominance among patients in Stage C ($p=0.05$), and 8% had Diabetes, with no difference between groups ($p=0.5$). The mean ejection fraction of the left ventricular of Stage C patients was $38\pm 9\%$ and $67\pm 5\%$ in stage A patients. On evaluating the association between the genotypes of the I/D polymorphisms of TNF-308 and the ACE gene and the distinct clinical forms in CD, an association was found between genotype A in the polymorphism of ACE and permanence in Stage A. The pattern did not remain when the evaluation of OR was adjusted for sex, age and use of benznidazole, nor did it in the study by alleles, thus showing evidence of the absence of association between all of the polymorphisms studied. **Conclusion:** The TNF-308 polymorphisms and the I/D of the ACE gene surveyed were not found to be risk factors for the development of serious CCC.

Descriptors: Chagas disease/genetic. Chagas disease/complications. Chagas cardiomyopathy. Genetic polymorphism. Biomarkers. Neglected diseases

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

Descrita, de forma singular, pelo médico Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909¹, a Tripanossomíase americana, posteriormente denominada de doença de Chagas (DCh), continua sendo um problema de saúde pública. O pesquisador, desde então, compreendeu a magnitude da doença e descreveu peculiaridades quanto à apresentação clínica, aos aspectos epidemiológicos, anatomopatológicos e político-sociais. Mais recentemente, com base nos estudos em vestígios arqueológicos, usando técnicas de biologia molecular, foi demonstrada a presença de *Trypanosoma cruzi* em tecidos de múmias com 9.000 anos de idade, na região dos Vales Andinos, sugerindo a possibilidade da existência da doença anteriormente aos relatos de Carlos Chagas².

A Organização Mundial de Saúde estima entre 7 a 8 milhões de pessoas infectadas no mundo, principalmente na América Latina, onde a DCh é endêmica³. Nas últimas décadas, o fenômeno migratório modificou o perfil epidemiológico, globalizando a doença. Dessa forma, atualmente portadores da DCh são encontrados também na América do Norte⁴, nos países da Europa⁵ e na Ásia⁶.



Figura 1. Doença de Chagas - número estimado de casos e *status* da transmissão vetorial (Ribeiro A *et al.* Nat Rev Cardiol., 2012;9:577)

Nos países não endêmicos, a transmissão da DCh acontece mediante a contaminação transfusional, congênita e por transplante. Estimativas recentes na América do Norte sugerem valores de aproximadamente 300.000 a 1 milhão de casos nos Estados Unidos^{7,8} e, no México, os números oscilam de 1 a 6 milhões^{7,9}. Na Europa, documentou-se maior prevalência na Espanha, seguida da Itália¹⁰.

No Brasil, a doença transmitida pelo vetor *Triatoma infestans*, principal responsável pela disseminação do *T. cruzi*, foi carregada ao Rio Grande do Sul por movimentos migratórios da Argentina e do Uruguai. Com a expansão da lavoura cafeeira, atingiu São Paulo e disseminou-se progressivamente, por todo o país, adaptando-se às regiões onde havia comprometidas condições de moradia¹¹. Em 1948, as experiências de Dias e Pellegrino, com o uso de inseticidas residuais, foram de grande importância para o controle vetorial.

Entre 1980 a 1990, São Paulo já mostrava resultados favoráveis com ações efetivas nos programas de prevenção, período que também foi implantado o programa de controle dos bancos de sangue do país. Entre 1990 a 2000, deflagraram-se as ações da “Iniciativa do Cone Sul”. E finalmente em 2006, o Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde.¹² No entanto, é importante ressaltar que tal certificado representava o controle efetivo da doença no Brasil por esse *Triatoma*, mas não eliminava a necessidade de ações de controle e vigilância permanentes. É inegável que significantes conquistas aconteceram no país¹³. A despeito desse resultado positivo, estimam-se, ainda, entre 2 a 3 milhões de casos remanescentes¹⁴, com 0,6% do número de mortes com a menção de DCh no atestado de óbito (1999 – 2007)¹⁵. Dados colhidos a partir da última avaliação sorológica entre crianças abaixo de 5 anos, de toda área rural brasileira, com exceção do Rio de Janeiro, a infecção por *T. cruzi* foi estimada em 0,03%, sendo que as crianças as quais provavelmente apresentaram a doença por contaminação vetorial estiveram concentradas, predominantemente, na região Nordeste. Outras diferenças regionais também são encontradas quanto às formas de transmissão. Quanto à infecção congênita, 60% dos casos estiveram presentes no Rio Grande do Sul, considerando, assim, a possibilidade da relação com as cepas específicas de *T. cruzi*, que são mais frequentes em países vizinhos, como o Uruguai, que apresenta maiores taxas desse tipo de contaminação¹⁶. Quanto à mortalidade, analisando-se as tendências ao longo do tempo (1999-2007), evidenciou-se a existência de heterogeneidade entre as

regiões do país. A região Nordeste apresenta novamente indicadores mais desfavoráveis, com mortalidade em curva de crescimento¹⁵.

Tentando justificar esse perfil desfavorável nessa região, surgem algumas hipóteses, como a do controle e a da prevenção da DCh que, na região, têm sido negligentes. Os dados podem ser atribuídos ao elevado número de espécies de vetores presentes e à dificuldade de controle de vetores secundários, encontrados, na região de difícil rastreamento, pelos métodos rotineiros. No Nordeste, os mais frequentemente encontrados são o *Triatoma brasiliensis* e o *T. Pseudomaculata*. As ações que justificaram o Brasil receber a certificação internacional foram ações com sucesso para o controle do *T. Infestans*. Também, casos de contaminação por vias oral e congênita, agregados a indicadores socioeconômicos baixos, em conjunto, podem estar contribuindo para a manutenção desse desempenho desfavorável na região Nordeste¹⁷. É possível também que o perfil genotípico populacional possa implicar a susceptibilidade diferenciada¹⁸.

Desde sua descrição como humanista visionário, Carlos Chagas alertou para as implicações biossociais da gênese, evolução e continuação da DCh. Apesar de ações singulares, como a criação de ambulatórios e associações com fim específico, seus portadores continuam vivendo em condições socioeconômicas comprometidas, mantendo baixa a escolaridade e a formação profissional. Desse modo, o inexorável ciclo da pobreza e da doença se perpetua¹⁹.

1.2 Formas clínicas

De acordo com a evolução, a DCh é classificada em fases aguda e crônica. A fase aguda é predominantemente assintomática, e a morte ocorre entre 5% a 10% dos casos sintomáticos, principalmente por miocardite ou meningoencefalite²⁰. Outras manifestações relacionadas ao sistema nervoso podem ser também encontradas na fase aguda²¹. Na fase crônica, em associação à forma cardíaca ou de forma isolada, o comprometimento digestivo pode ocorrer com a formação de megacólon ou megaesôfago.

Na fase crônica, amplo espectro de apresentações pode ser encontrado, variando desde a forma indeterminada, com favorável evolução²², até pacientes com grave envolvimento cardíaco. O próprio Carlos Chagas já comentava sobre o grande número de pessoas que iriam permanecer até a idade avançada na forma benigna da doença²³. Até o momento, prevalece o diagnóstico da forma indeterminada, definida pela ausência de manifestações clínicas cardíacas, digestivas ou neurológicas, com ausência de alterações no eletrocardiograma (ECG), e radiológicas do coração e do tubo digestivo²⁴. Recentemente, uma avaliação entre portadores de DCh, doadores de sangue assintomáticos, revelou que, em 10 anos, a taxa de incidência da Cardiopatia Chagásica Crônica (CCC) seria 1,85 por 100 pessoas/ano²⁵. De fato, um dos aspectos mais enigmáticos e obscuros na DCh refere-se a esse período silencioso, fase essa em que parece se decidir o “destino” do paciente na permanência como forma indeterminada ou a evolução para a forma aparente da doença.

Entre portadores de insuficiência cardíaca (IC), síndrome clínica com prognóstico desfavorável, a DCh como etiologia agrega maior risco no que se refere à evolução. Em recente publicação, ressaltou-se que a etiologia chagásica foi associada, de forma independente, a um pior prognóstico relacionado à mortalidade (*hazard ratio* = 2,48), quando comparada à miocardiopatia dilatada idiopática, mesmo após ajuste para outros consagrados preditores de mortalidade, como pressão sistólica, duração do QRS e do peptídeo natriurético cerebral (BNP)²⁶.

Com o objetivo de uniformizar a caracterização das apresentações clínicas e nortear condutas, nova classificação foi apresentada na “I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica”²⁷ (Figura 2).

Fase aguda	Fase crônica				
	Forma indeterminada	Forma cardíaca sem disfunção ventricular	Forma cardíaca com disfunção ventricular		
	A	B1	B2	C	D
Pacientes com quadro compatível à DCh aguda	Pacientes com risco de desenvolver IC possuem sorologia positiva, não têm cardiopatia estrutural ou sintomas de IC. Também não têm alterações digestivas	Pacientes com cardiopatia estrutural, evidenciada por alterações eletrocardiográficas ou ecocardiográficas, mas com função ventricular global normal e sem sinais e sintomas atuais ou prévios de IC	Pacientes com cardiopatia estrutural, caracterizada por disfunção ventricular global, mas sem sinais e sintomas prévios ou atuais de IC	Pacientes com disfunção ventricular e sintomas prévios ou atuais de ICC (NYHA I, II, III, IV)	Pacientes com sintomas refratários de IC em repouso, apesar de tratamento clínico otimizado, necessitando de intervenções especializadas

Figura 2. Classificação clínica da cardiopatia chagásica crônica (Andrade JP et al. - I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da CCC)

Diante da apresentação heterogênea na DCh, com tão distintas formas de apresentação, buscam-se indicadores prognósticos²⁸. Vários estudos

longitudinais, incorporando variáveis clínico-laboratoriais, ajudaram a definir marcadores prognósticos^{29,30}. No entanto, alguns fatores são limitantes nessas avaliações, entre eles a heterogeneidade das populações estudadas. O escore proposto por Rassi Jr. e colaboradores foi adequadamente validado, propondo uma interessante ferramenta para a definição de risco de morte em 5 e 10 anos³¹. Em relação à revisão sistemática quanto a preditores de mortalidade na DCh, a disfunção ventricular esquerda, classe funcional III e IV da *New York Heart Association* (NYHA), a cardiomegalia e a taquicardia ventricular não sustentada indicam pior prognóstico entre portadores da DCh³².

De fato, a predição do risco de morte na DCh continua sendo um grande desafio, e maior ainda é a identificação de fatores determinantes das formas, sobretudo do tipo de acometimento cardíaco. Assim, é possível que marcadores moleculares e genéticos possam contribuir significativamente, nesse cenário.

1.3 Patogenia

A DCh é a mais importante infecção parasitária, que envolve o coração³³. Apesar de sua relevância, a fisiopatogenia da CCC ainda não está completamente esclarecida. Vários mecanismos são considerados, entre eles disautonomia, disfunção microvascular, autoimunidade e dano miocárdico, dependente da presença do parasita ou por mecanismos imunes³⁴. Na compreensão contemporânea, sugere-se que a persistência do parasita no

miocárdio e a desregulação da resposta imune assumem papel fundamental, embora se mantenham fortes indícios de que todos os fatores se desenvolvem em conjunto, formando uma complexa cadeia de fenômenos, que, interligados, desenham a elaborada patogenia da DCh³⁴⁻³⁶.

Quanto à patogênese de fase aguda, observa-se alta parasitemia e parasitismo cardíaco, importante ativação do sistema imune com aumento de proliferação, ativação de células B e T e aumento de atividade de mediadores inflamatórios³⁷. Na fase crônica, o encontro de formas parasitárias (amastigotas) em tecido cardíaco é menos frequente, exigindo tempo de análise dos tecidos. Contudo, DNA e antígenos do parasito são detectados por métodos mais sensíveis (PCR e imunoistoquímica). A intensidade da inflamação é variável, mas o infiltrado inflamatório é composto, predominantemente, de mononucleares (com maioria de linfócitos e macrófagos)³⁶.

A infecção por *T. cruzi* induz à produção abundante de citocinas não só do tipo I – pró-inflamatórias, como o interferon-gama (IFN γ), a interleucina (IL)-12 e o fator de necrose tumoral (TNF), que atuam, de forma importante, no controle da disseminação do parasita, como também citocinas imunorreguladoras, tais como o fator transformador de crescimento beta (TGF β) e a IL-10³⁸.

O TNF atua na replicação do parasita, na fase aguda, mediante a liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados. Na fase crônica, são encontrados níveis elevados de TNF, correlacionando-se com o grau de disfunção cardíaca³⁹.

Conforme a figura 3, é possível sugerir o papel dualístico para o TNF na DCh, sabendo-se que altos níveis seriam benéficos na fase aguda (controle do parasita) e deletérios na fase crônica, com piora do processo inflamatório típico da CCC⁴⁰.

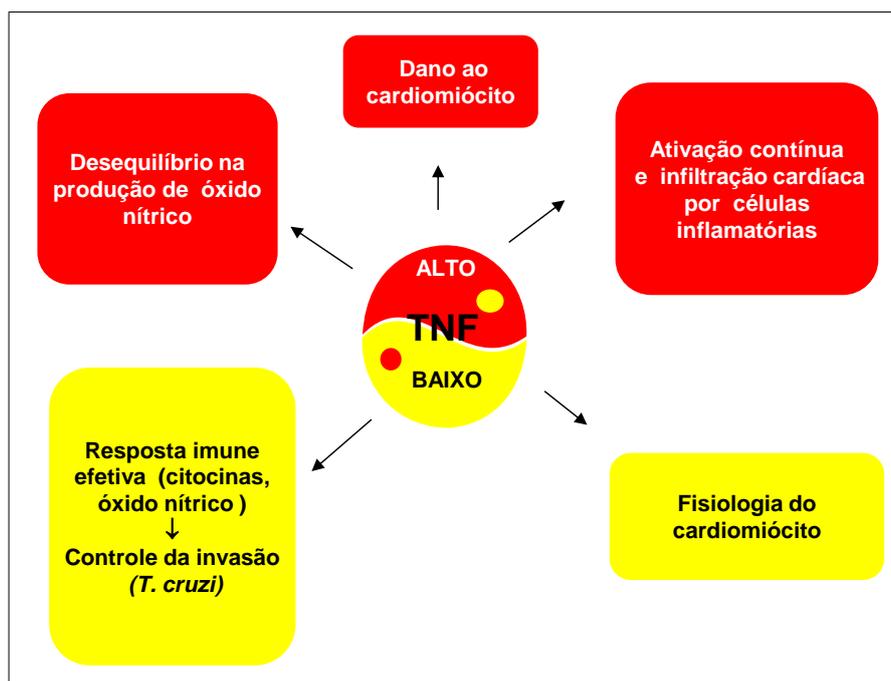


Figura 3. Modelo hipotético da ação do TNF no coração, sob condições fisiológicas (baixa concentração de TNF – amarelo) e patológicas (altas concentrações de TNF – vermelho) (modificado de Lannes-Vieira J *et al.*, 2011)

Na CCC, várias citocinas produzidas no miocárdio podem também ter um efeito não imunológico por meio da modulação da expressão de genes e de proteínas em cardiomiócitos e de outros tipos de células presentes no miocárdio. Polimorfismos genéticos de citocinas, quimiocinas e os genes da resposta imune inata têm sido associados à progressão da DCh^{18,41}.

1.4 Genética

A complexidade do desenvolvimento de uma doença infecciosa está relacionada a diversos fatores referentes ao hospedeiro e ao ambiente (figura 4). A exposição a um agente infeccioso não resulta, necessariamente, em infecção assim como esta não se apresenta uniformemente, mas, com diversos fenótipos clínicos e ou biológicos. Louis Pasteur, criador da teoria microbiana, já considerava o fator hereditariedade do hospedeiro na suscetibilidade à infecção⁴². Tanto a avaliação de características genéticas do hospedeiro como a do patógeno podem ter importância nesse cenário.

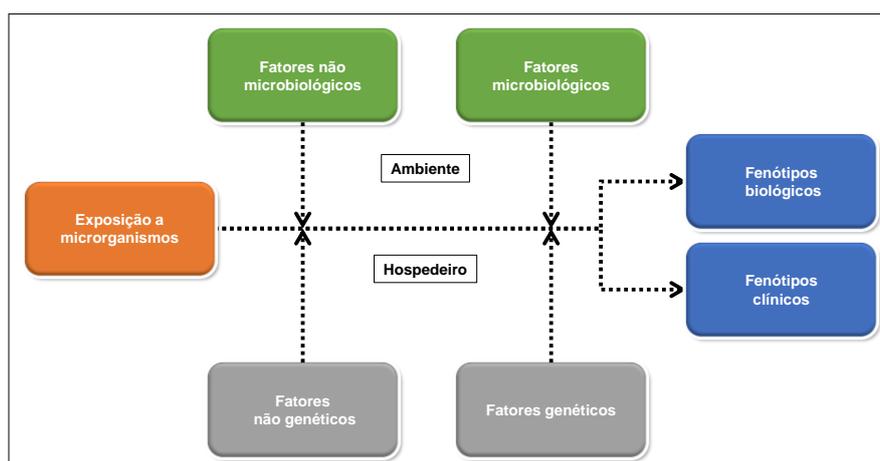


Figura 4. Fases da interação hospedeiro-ambiente no decorrer de uma infecção (modificado de Casanova JL e Abel L, 2004)

Os estudos de polimorfismo genético ajudam a compreender como a genética do hospedeiro pode influenciar no desenvolvimento da doença ou na gravidade da apresentação. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são definidos, quando, pelo menos, dois nucleotídeos alternativos ocorrem no genoma, em frequências apreciáveis (geralmente >1%). Os SNPs exibem herança mendeliana e são usados como marcadores genéticos⁴².

Na última década, inúmeros ensaios vêm sendo realizados, investigando o polimorfismo gênico na DCh. A avaliação do polimorfismo de moléculas envolvidas na resposta imune inata, na adaptativa e na sua regulação durante a infecção pelo *T. cruzi* tem sido alvo de pesquisas, tendo em vista a importância na patogênese da doença.

A avaliação genética de interleucinas e quimiocinas na DCh tem sido realizada no Brasil^{18,43-46} e em outros países da América do Sul⁴⁷.

A proposta do envolvimento do TNF na progressão da IC com variantes gênicas do promotor dessa citocina e seu papel no potencial evolutivo para IC tem sido avaliada. Resultados conflitantes têm sido apresentados. Variáveis importantes são desconsideradas nas análises, como idade, comorbidades e função ventricular⁴⁷.

Vários estudos brasileiros de SNPs no gene TNF já foram realizados. Drigo e colaboradores⁴⁸ avaliaram pacientes em centros médicos de São Paulo e demonstraram que, na população portadora de CCC com fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) menor ou igual a 40%, carreadores do alelo TNF-308A estavam associados a um menor tempo de sobrevida. O mesmo grupo, um ano após, apresentou resultados de nova análise, demonstrando a não associação com o desenvolvimento da forma cardíaca, quando comparadas distintas formas clínicas, como também com a progressão da doença⁴⁹. Por outro lado, Pissetti e colaboradores estudaram pacientes com a forma indeterminada, comparados a portadores da forma cardíaca na região do Triângulo Mineiro (MG, Brasil), mostrando que a ausência do polimorfismo do TNF-238 A está associada à sorologia negativa, o que sugere sua influência na

susceptibilidade à infecção e, ainda, que esse alelo é associado com maior produção de TNF em indivíduos soropositivos. Por outro lado, este estudo mostrou que o alelo TNF-308A não apresentou tal associação⁵⁰. Entende-se, assim, que, em relação à avaliação genética dessa citocina, persiste a divergência de resultados, não sendo, até o momento, possível se definir a importância do polimorfismo gênico de TNF na DCh.

O polimorfismo da enzima conversora da angiotensina (ECA), em especial o genótipo DD, foi associado a risco de IC⁵¹, à mortalidade⁵² e à evolução ecocardiográfica desfavorável⁵³ em diferentes etiologias de miocardiopatia, como a alcoólica e idiopática^{51,52}. Contudo, publicações com resultados discordantes também têm sido encontradas na miocardiopatia dilatada idiopática^{54,55}.

Na DCh, também foi estudada a associação do polimorfismo da ECA com a evolução clínica. Em estudo venezuelano, os pesquisadores avaliaram envolvimento de variantes funcionais DD (deleção/deleção), ID (inserção/deleção), II (inserção/inserção) do gene da ECA, verificando a associação quanto à gravidade. Os autores não registraram associação do genótipo com a progressão da doença⁵⁶.

Considerando o reservado prognóstico e as altas taxas de mortalidade, especialmente entre portadores de IC de etiologia chagásica, é necessária a busca por estratificação mais adequada.

Dados já publicados sugerem que fatores genéticos podem estar envolvidos no desenvolvimento das manifestações diversas da DCh^{48,50,57,58}, e

a identificação desses marcadores pode sugerir estratégias que facilitem uma tomada de decisão mais precoce, de forma dirigida ou individualizada.

Limitações de estudos atualmente disponíveis restringem a possível aplicação dessa estratégia. Esse cenário ainda persiste nessa área de pesquisa, especialmente no Nordeste brasileiro, onde inexistem avaliações. Diante dos inconclusivos estudos acerca do papel do polimorfismo do TNF-308 e da ECA I/D como fator de risco para o desenvolvimento de miocardiopatia na DCh, a hipótese formulada para conduzir essa pesquisa foi a da associação entre marcadores genéticos e formas clínicas da DCh na população do Nordeste brasileiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Verificar se polimorfismos da enzima conversora de angiotensina (I/D da ECA) e do fator de necrose tumoral (TNF-308) são marcadores de risco para a ocorrência da forma grave da CCC, quando comparada à forma sem doença cardíaca aparente no Nordeste brasileiro.

2.2 Específicos

- Avaliar a associação dos níveis de TNF no soro com a expressão de polimorfismos de TNF-308;
- Avaliar níveis de TNF no soro e verificar a associação com a expressão clínica da DCh;
- Avaliar a correlação dos níveis de TNF no soro com a FEVE ao ecocardiograma.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

Pacientes com diagnóstico de DCh foram avaliados no período de maio de 2010 a julho de 2014, no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca e no Pronto-Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) – Universidade de Pernambuco/UPE. O Ambulatório de DCh e Insuficiência Cardíaca foi fundado em 1987, sendo o centro de referência no Estado de Pernambuco para diagnóstico clínico e tratamento da DCh (Secretaria Estadual de Saúde/Secretaria de Ciência e Tecnologia, portaria: 20 de abril de 2012).

O cálculo do tamanho da amostra foi dimensionado de acordo com o desenho do estudo, caso-controle, não pareado, sendo os casos os pacientes do estágio C e os controles os do estágio A. Foi adotada a classificação em estágios de acordo com a “I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica”²⁷.

Para a análise do cálculo amostral:

- **Polimorfismo do fator de necrose tumoral (TNF-308)**

Considerou-se a presença do alelo TNF2. Assumindo um nível de significância de 5%, poder de 80%, proporção de expostos (ou seja, proporção de alelo TNF) entre os casos de 32,7% e nos controles de 13,6%⁵⁸, tamanho mínimo da amostra é de 59 casos e 59 controles (na proporção de 1 caso para 1 controle).

- **Polimorfismo da enzima da conversão da angiotensina (ECA)**

Assumindo um nível de significância de 5%, poder de 80%, ou seja, proporção entre os casos de 60% e nos controles de 40%⁵⁹, o tamanho mínimo da amostra é de 97 casos e 97 controles (proporção de 1 caso para 1 controle).

Diante do cálculo dos dois polimorfismos estudados, optou-se por seguir o maior número, isto é, 97 pacientes por grupo estudado.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE - UPE sob o protocolo 80210 (reunião: 12/2010). Para início do doutorado, foi obtida a ciência pelo Comitê de Ética em Pesquisa/USP em 17/01/2012. Como parte do estudo intitulado “Patogenia da Doença de Chagas: a percepção sobre sua condição, fatores imunológicos e genéticos, influenciando o desenvolvimento de formas clínicas” inicialmente, foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos FIOCRUZ, sob o protocolo 541/09, emitido em 22/02/2010.

3.2 Critérios de inclusão

Foram considerados elegíveis:

- **Portadores de DCh com classificação clínica nos estágios A ou C** de acordo com a “I Diretriz Latino-americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica”²⁷ e a comprovação por dois métodos sorológicos realizados no Laboratório Central de Pernambuco - Lacen – Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco;

- Pacientes com idade superior a 18 anos, de ambos os sexos;
- Aceitação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.3 Critérios de exclusão

- Pacientes portadores de DCh, com classificação nos estágios B1 e B2, segundo a “I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica”²⁷;
- Pacientes portadores de câncer;
- Pacientes portadores de doença renal crônica, conhecida previamente ao quadro de descompensação (creatinina >2,5 mg/dL e uréia >100 mg/dL e/ou *clearance* de creatinina <50 mL/Kg/min);
- Portadores de doença coronária definida por história de angor associada a alterações em exames complementares (ECG, teste ergométrico, ecocardiograma, cintilografia miocárdica ou cateterismo cardíaco) ou passado de intervenção (angioplastia coronariana percutânea ou revascularização do miocárdio)⁶⁰;
- Portadores de cardiopatia valvar (baseada na anamnese, no exame físico e na comprovação ao ecocardiograma);
- Pacientes portadores de comprometimento digestivo, megaesôfago ou megacólon. Avaliados por queixas ou esofagograma, ou já submetidos à cirurgia para as patologias correspondentes;
- Pacientes naturais de estados que não fazem parte da região Nordeste do Brasil.

3.4 População estudada

Os pacientes foram avaliados, dividindo-se em 2 grupos:

Grupo cardiopatia chagásica crônica (Grupo estágio C)

- Portadores de sorologia comprovada por dois métodos para *T. cruzi*, realizados no Laboratório Central de Pernambuco - Lacen – Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco;
- Pacientes classificados em estágio C, de acordo com a “I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica”²⁷, isto é, pacientes com disfunção ventricular e sintomas prévios ou atuais de IC.

O diagnóstico clínico de IC seguiu os critérios de Framingham, com presença simultânea de dois critérios maiores ou um critério maior e dois menores⁶¹.

Critérios maiores

- dispnéia paroxística noturna;
- estase jugular;
- estertores pulmonares;
- cardiomegalia (índice cardiotorácico; ICT >0,5);
- edema agudo de pulmão;
- terceira bulha cardíaca;
- refluxo hepato-jugular;
- perda de peso >4,5 Kg em 5 dias, em resposta ao tratamento.

Critérios menores

- edema bilateral de membros inferiores;
- tosse noturna;
- dispnéia de esforço;

- hepatomegalia;
- derrame pleural;
- redução da capacidade funcional em um terço da máxima;
- taquicardia (frequência cardíaca >100 batimentos por minuto - bpm);
- comprovação de IC sistólica através da FEVE <50% ao ecocardiograma.

Grupo sem cardiopatia aparente (Grupo estágio A)

- Portadores de sorologia comprovada por dois métodos para *T. cruzi*, realizados no Laboratório Central de Pernambuco - Lacen – Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco;
- Pacientes assintomáticos do ponto de vista cardiovascular com ECG, radiografia de tórax e ecocardiograma dentro dos parâmetros da normalidade incluídos na classificação - estágio A de acordo com a “I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica”²⁷.

O grupo de não infectados foi exclusivamente constituído para a avaliação da análise do TNF sérico. Pacientes assintomáticos do ponto de vista cardiovascular com sorologia negativa comprovada por dois métodos para *T. cruzi*, realizados no Laboratório Central de Pernambuco - Lacen – Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco; selecionados entre frequentadores do mesmo ambulatório onde foram incluídos os demais pacientes.

3.5 Fluxo do estudo

As diferentes etapas do processo de seleção dos pacientes, coleta e processamento de dados e amostras biológicas, encontram-se resumidas na Figura 5.

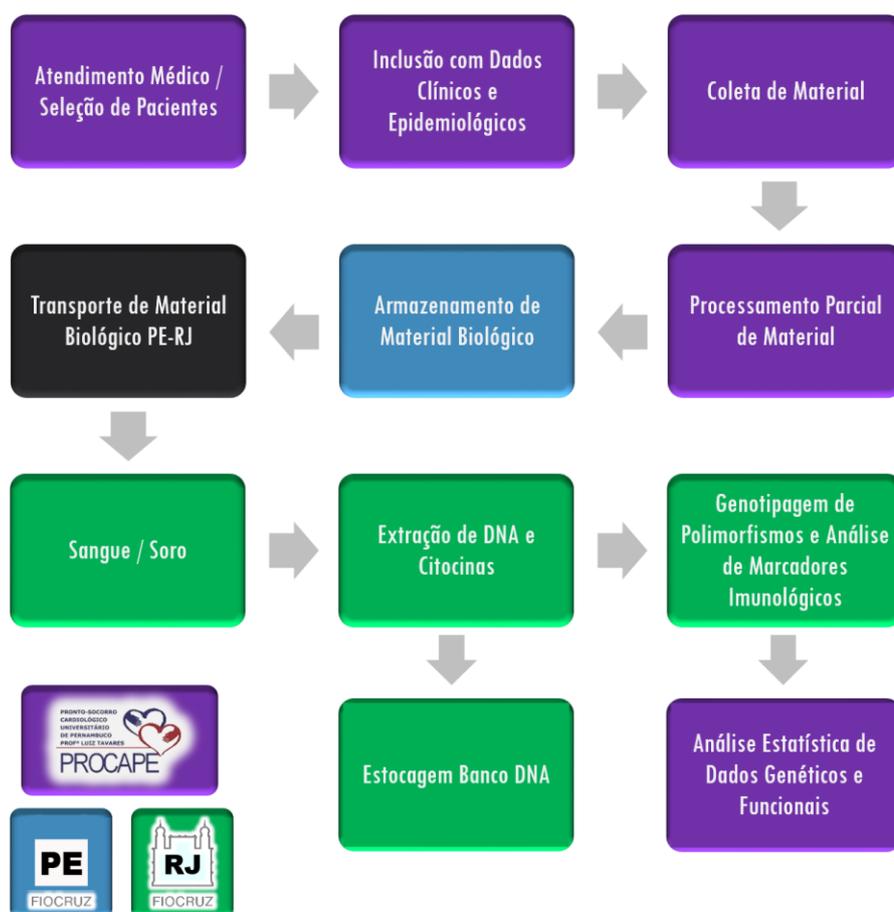


Figura 5. Execução, seleção e coleta

O estudo intitulado “Patogenia da doença de Chagas: a percepção sobre sua condição, fatores imunológicos e genéticos, influenciando o desenvolvimento de formas clínicas, incluiu 666 pacientes. Utilizando-se dos

critérios de inclusão e exclusão do presente estudo, foi necessário efetuar a exclusão de 465 pacientes do estudo principal (Figura 6).

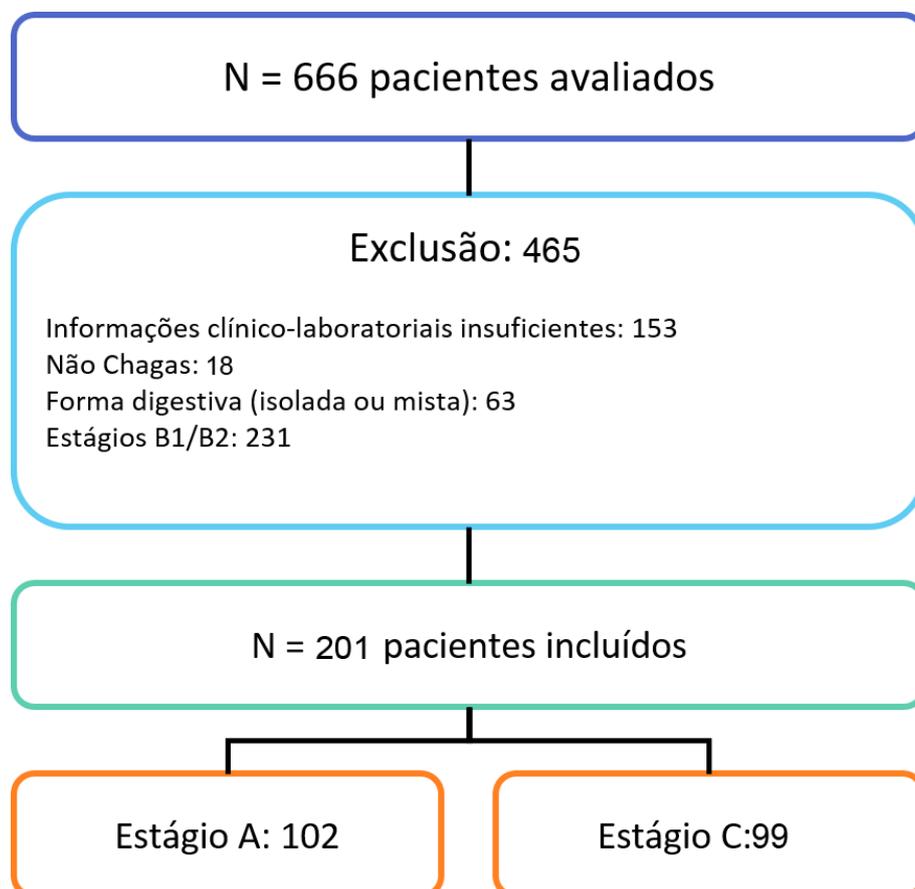


Figura 6. Desenho do estudo

A seleção dos pacientes e a coleta do material biológico foram realizadas no Ambulatório de Doença de Chagas e Insuficiência Cardíaca do PROCAPE/UPE, e os exames complementares foram realizados nesse mesmo hospital. As demais análises laboratoriais foram realizadas no Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/Rio de Janeiro).

3.5.1 Avaliação clínica/complementar

A avaliação clínica foi realizada incluindo anamnese, exame físico, ECG e ecocardiograma para reavaliação dos critérios de inclusão e exclusão²⁷.

O ECG foi realizado em Eletrocardiógrafo com 3 canais e 12 derivações (*Ecafifx*). As dimensões e função ventricular esquerda regional e global foram avaliadas pela abordagem 2-dimensional e *M-mode*, de acordo com a Sociedade Americana de Ecocardiografia, utilizando-se do aparelho da marca *Vivid 3*, com transdutor eletrônico de 2,5 MHz e dotado de segunda harmônica (*General Eletric – GE, EUA*).

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo. Após explicação, foi assinado o TCLE pelo paciente ou por seu responsável legal, sendo uma via de cada TCLE entregue ao paciente e a outra arquivada.

3.5.2 Dosagens sanguíneas

– Coleta de sangue

A coleta de amostra sanguínea foi realizada por venopunção. Para cada paciente, foram coletados dois tubos de sangue periférico: um primeiro tubo contendo EDTA como anticoagulante (Código 367861, *BD Vacutainer*) para a extração do DNA e um segundo tubo seco (Código 367812, *BD Vacutainer*) para a obtenção de soro.

Os tubos secos foram centrifugados a 900g por 10 minutos, e o soro obtido foi alíquotado em microtubos de 2,0 mL. Tanto as alíquotas de soro

como as amostras com EDTA foram estocadas a -70°C temporariamente, na Fiocruz/PE para posterior encaminhamento à Fiocruz do Rio de Janeiro. O transporte das amostras foi realizado segundo as regras internacionais da IATA (*International Air Transport Association*).

Na Fiocruz do RJ, o material biológico se manteve estocado a -80°C , e foram desenvolvidas as etapas da extração do DNA e genotipagem dos polimorfismos e, posteriormente, a dosagem de citocina.

3.5.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada seguindo uma técnica modificada de precipitação por *salting out*. O DNA de cada amostra foi quantificado por meio de um espectrofotômetro Nano-Drop ND-1000 (*NanoDrop Technologies, EUA*) (figura 7). Com base na quantificação do DNA de cada uma das amostras, foram desenhadas placas de diluição, visando a uma concentração aproximada de 20 - 40 ng/ μL para a genotipagem. O restante do DNA não diluído encontra-se estocado em Banco de DNA (-80°C), sob responsabilidade da Dra. Joseli Lannes (Laboratório Biologia das Interações - Laboratório Biologia da Interação/Fiocruz/RJ).

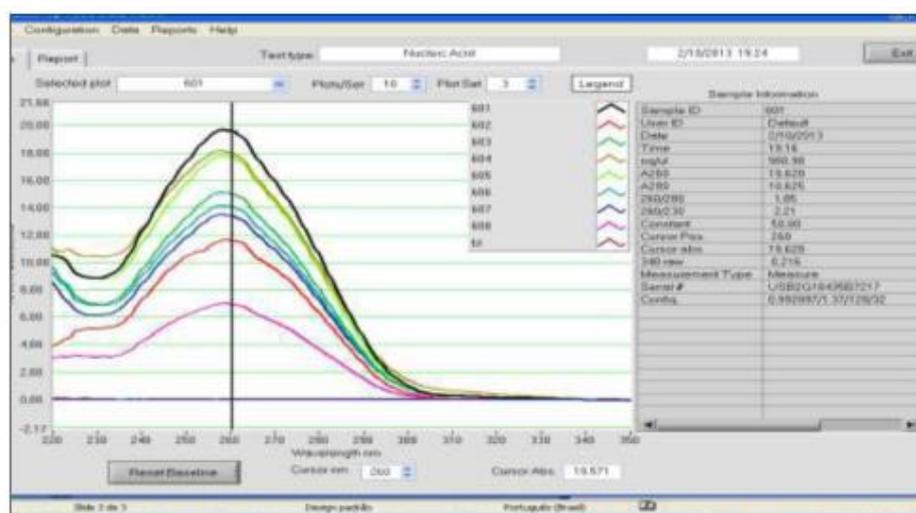


Figura 7. Espectofotometria por Nanodrop

3.5.4 Genotipagem

A genotipagem do polimorfismo do TNF-308 foi realizada por meio da metodologia TaqMan (*Life Technologies, EUA*) de discriminação alélica por PCR em tempo real, na qual cada alelo é identificado mediante uso de uma sonda específica contendo um marcador fluorescente (VIC ou FAM). Os genótipos são determinados em função da intensidade de cada fluorescência por meio da análise do gráfico de discriminação alélica, conforme apresentado na figura 8.

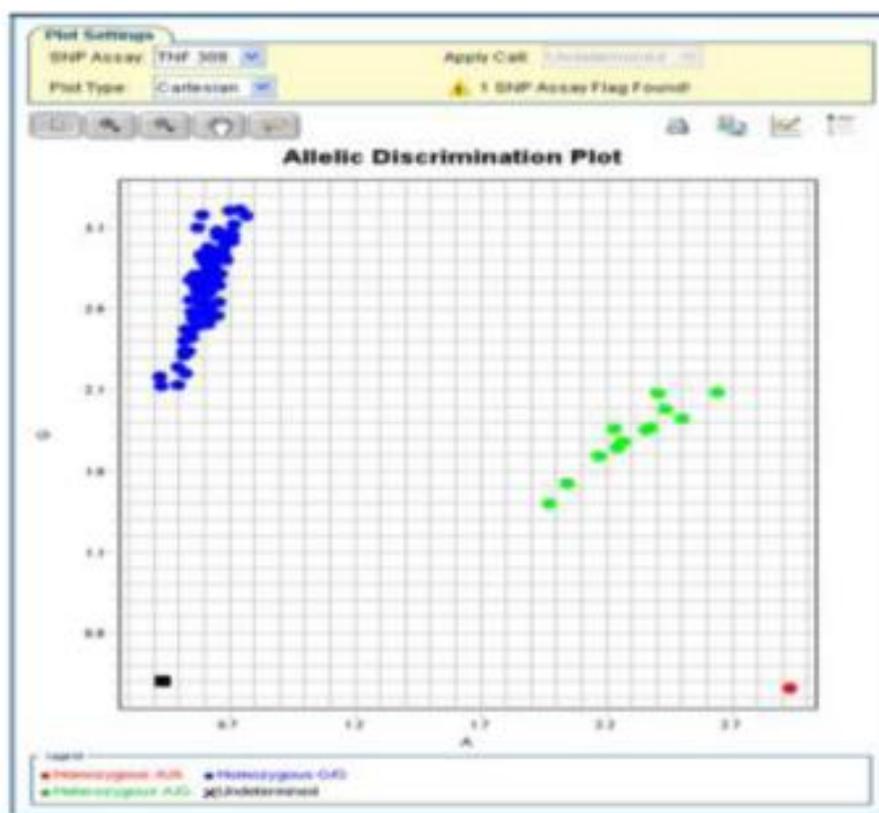


Figura 8. Gráfico de discriminação alélica do SNP TNF-308 G>A (rs 1800629). A caracterização dos genótipos é realizada em função da intensidade dos marcadores fluorescentes associados a sondas específicas para cada alelo (em azul: amostras de genótipo GG; em verde: amostras GA; em vermelho: amostra de genótipo AA)

As reações de PCR foram realizadas no equipamento *StepOne™ Real-Time PCR Systems*, seguindo as condições padrão para ciclagem: 60°C (30 segundos), 95°C (10 minutos), seguido de 45 ciclos de 92°C (15 segundos) e 60°C (1 minuto). Cada reação de amplificação foi feita para um volume final de 5 µL contendo 2,5 µL do reagente para genotipagem *TaqMan® Genotyping Master Mix* (#4371357, *Applied Biosystems, EUA*), 0,12 µL do ensaio de genotipagem e 2 µL de DNA diluído em concentração aproximada de 20 a 50 ng.

As informações básicas a respeito de cada um dos polimorfismos encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1. Características gerais dos SNPs e ensaios de genotipagem correspondentes

Gene	Região	NP	Roca	Código dbSNP	Ensaio para genotipagem
TNF	6p21	308	>A	rs1800629	C___7514879_10
ECA	287bp	I/D		rs4646994	Chromosome 17

*Código do ensaio fornecido pelo fabricante (*Life Technologies, CA, USA*)

3.5.5 Quantificação dos níveis séricos da citocina TNF

Para analisar a produção de TNF, foram selecionados soros de 122 pacientes portadores de sorologia positiva para *T. cruzi*, de forma aleatória, e 22 pacientes com sorologia negativa para o controle, todos frequentadores do mesmo ambulatório.

A dosagem foi feita por meio da metodologia de ELISA, com o auxílio dos kits *DuoSet (R&D, EUA)* para dosagem de TNF (Referência DY210), conforme as recomendações do fabricante. Todas as amostras e controles foram testados em duplicata e a média de ambas as leituras foi considerada para análise.

Nas análises para verificação de associação, foram utilizados, apenas, os portadores que produziram médias e altas concentrações de TNF (*high and medium TNF producers*), tendo em vista que o alto número de pacientes com resultados próximos a zero iria comprometer a análise final, e tais amostras

não se apresentaram adequadas. Para o cálculo dos *medium and high producers* foi realizado gráfico da distribuição geral dos valores de TNF sem estratificação por grupos, traçado mediana e determinado o ponto de corte. Foram considerados *medium and high producers* os indivíduos com dosagem igual ou acima desse ponto de corte.

3.6 Análise estatística

Para a construção do perfil dos participantes, foi calculada a distribuição de frequência das variáveis qualitativas e as estatísticas descritivas, média, mediana, desvio-padrão, mínimo e máximo para as variáveis quantitativas. A variável dependente foi o grupo caso (estágio C) e o controle (estágio A). As variáveis independentes foram os fatores de risco de interesse para esse estudo caso-controle, tal como presença dos polimorfismos de estudo da ECA e do TNF. Para a comparação dos grupos (caso x controle) em relação às variáveis qualitativas, foi aplicado o teste Qui-Quadrado de Pearson, ou Exato de Fisher, quando necessário. Para as variáveis quantitativas, utilizou-se o teste t-Student nos casos em que a distribuição de normalidade não foi rejeitada, caso contrário foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O *odds ratio* ajustado foi calculado por meio do modelo de regressão logística e o Teste de Cochran Armitage para dose alélica. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Para a execução dos cálculos estatísticos, foi utilizado o programa SPSS for Windows, versão 18.0 – *Statistical Package for the Social Science*.

As comparações entre os níveis das citocinas em portadores dos diferentes genótipos e manifestações clínicas de interesse foram realizadas mediante o teste de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney, dependendo do número de grupos incluídos na comparação. A correlação entre o nível sérico do TNF e a FEVE (%) foi realizada por meio do cálculo do coeficiente de correlação de Spearman. Foram considerados significativos os testes com valor de p inferior a 0,05. Para essas análises, foi utilizado o *software* GraphPad Prism, versão 5 para Windows.

4. RESULTADOS

4.1 Características da população em estudo

Em nosso estudo, incluímos 201 pacientes portadores de sorologia positiva para *T. cruzi* que cumpriram os critérios de inclusão, detalhados nos itens 3.2/3.3. Segundo a caracterização clínica, foram incluídos, neste estudo, 102 portadores de DCh que constituíram o grupo em estágio A, sem cardiopatia aparente, e 99 portadores de CCC que formaram o grupo em estágio C (Tabela 3).

O perfil geral da população estudada demonstrou predominância feminina (63,7%), com idade média de 55 ± 13 anos, variando de 26 a 87 anos. A estratificação por faixa etária mostrou predominância (53,7%) de pacientes entre 46 a 65 anos, seguido de 24,9% com idade igual ou menor que 45 anos, e 21,4% de idosos (maiores que 65 anos). A estratificação por características étnico-raciais da população estudada, baseada na cor da pele, indicou que a maioria do grupo se autodeclarou parda (50,2%), seguida de branca (20,4%) e negra (8,5%).

A figura 9 apresenta a distribuição da naturalidade por macrorregiões de Pernambuco. Entre pacientes de outros estados nordestinos (18,9%) foram a Paraíba, seguido de Alagoas os com maiores frequências. De forma distinta, a naturalidade, quanto à procedência, praticamente metade dos pacientes residem na área metropolitana do estado (45,8%) e apenas 3,5% procedem de estados vizinhos. Todo o grupo apresentou baixos indicadores econômicos e culturais; mais da metade do grupo frequentou escola por, no máximo, 4 anos, e 64,7% informaram que tinham renda familiar de até um salário mínimo.

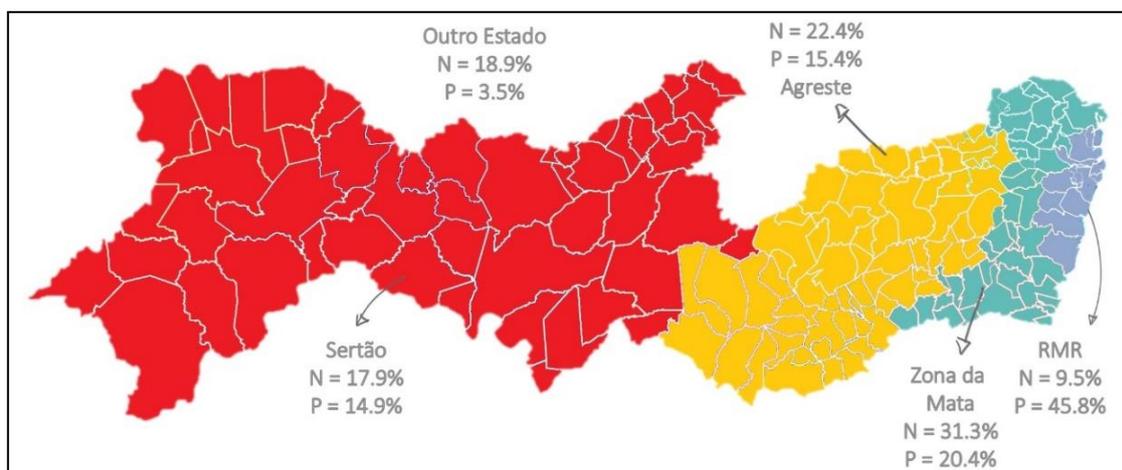


Figura 9. Distribuição dos pacientes entre as regiões do estado de Pernambuco

N: Naturalidade, P: procedência, RMR: região metropolitana do Recife-PE

Fonte: IBGE <http://www.ibge.gov.br> (modificado de Heloísa Maria Nogueira Diniz - IOC/Fiocruz)

A HAS esteve presente em 39,8% do total da população estudada. As frequências de tratamento com IECA/BRA e betabloqueador (BB) foram de 49,1% e 44,2%, respectivamente. O tratamento parasiticida com administração de benznidazol foi utilizado em 29,6% de todos os pacientes do estudo.

Os dados quanto às características clínico-epidemiológicas e uso de medicamentos comparados por grupos estão descritos nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Inerente à conceituação dos estágios A ou C, a FEVE média e o uso de medicamentos, como BB, IECA/BRA e benznidazol, são, de forma significativa, diferentes entre os grupos.

A média da idade dos portadores de DCh, classificados clinicamente nos estágios A e C, também mostrou significativa distinção, embora, ambos os grupos, se encontrem na 5ª década.

Tabela 2. Características clínicas quanto aos grupos analisados

Variáveis	Grupo A (N = 102)	Grupo C (N = 99)	p
Sexo Feminino	68 (66,7%)	60 (60,6%)	0,372
Idade (anos) Média ± DP	51 ± 12	59 ± 12	0,001*
Cor da pele			
Branco	22 (21,6%)	19 (19,2%)	0,524
Pardo	47 (46,1%)	54 (54,5%)	
Negro	8 (7,8%)	9 (9,1%)	
Não Informado	25 (24,5%)	17 (17,2%)	
Renda			
Até 1 SM	64 (62,7%)	66 (66,7%)	0,148
Entre 2 a 4 SM	14 (13,7%)	9 (9,1%)	
≥ 5 SM	18 (17,6%)	11 (11,1%)	
Não Informado	6 (5,9%)	13 (13,1%)	
Instrução (anos de estudo)			
Até 4 anos	54 (52,9%)	52 (52,5%)	0,947
> 4 anos	41 (40,2%)	39 (39,4%)	
Não Informado	7 (6,9%)	8 (8,1%)	
Naturalidade			
Agreste	25 (24,5%)	20 (20,2%)	0,009*
Zona da Mata	22 (21,6%)	41 (41,4%)	
RMR	9 (8,8%)	10 (10,1%)	
Sertão	26 (25,5%)	10 (10,1%)	
Outro Estado	20 (19,6%)	18 (18,2%)	
Procedência			
Agreste	18 (17,6%)	13 (13,1%)	0,033 _F *
Zona da Mata	16 (15,7%)	25 (25,3%)	
RMR	42 (41,2%)	50 (50,5%)	
Sertão	22 (21,6%)	8 (8,1%)	
Outro Estado	4 (3,9%)	3 (3,0%)	
Hipertensão arterial sistêmica	34 (33,3%)	46 (46,5%)	0,057
Diabetes Mellitus	7 (6,9%)	9 (9,1%)	0,560
FEVE - Média ± DP	67 ± 5	38 ± 9	<0,001*

* p < 0,05

N = número; DP = desvio padrão; F = teste exato de Fisher; RMR = Região Metropolitana de Recife

Tabela 3. Perfil do uso de medicamentos quanto aos grupos analisados

Medicamentos	Grupo A (N = 102)	Grupo C (N = 99)	p
Betabloqueador	12 (11,8%)	76 (76,7%)	<0,001
IECA/BRA	21 (20,6%)	77 (77,7%)	<0,001
Benznidazol	48 (47,1%)	12 (12,1%)	<0,001

4.2 Genotipagem: perfil e comparação quanto aos grupos analisados

Quanto ao polimorfismo TNF-308, o grupo apresentou predominância do genótipo GG (80%), enquanto o genótipo DI do polimorfismo do gene da ECA foi o de maior frequência (47%). A análise de distribuição dos genótipos e alelos na população quanto ao polimorfismo do TNF-308 e do polimorfismo I/D do gene ECA encontram-se nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Distribuição dos genótipos do polimorfismo do TNF-308

TNF	TODOS (N = 198)
GG	159 (80%)
GA	37 (19%)
AA	2 (1%)
Alelo G	355 (90%)
Alelo A	41 (10%)

Tabela 5. Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene da ECA I/D

ECA	TODOS (N = 199)
DD	68 (34,1%)
DI	93 (46,7%)
II	38 (19%)
Alelo D	229 (58%)
Alelo I	169 (42%)

Nessa população do Nordeste brasileiro, a avaliação de associação entre os genótipos dos polimorfismos TNF-308 e I/D da ECA e as distintas formas clínicas na DCh mostrou que tais polimorfismos não se constituíram marcadores de risco para a ocorrência de IC (estágio C). O mesmo padrão permaneceu quando a avaliação do OR foi ajustada para sexo, idade e uso de

benznidazol. Quando analisados por distribuição de alelos, observamos manutenção dos resultados do polimorfismo do TNF-308 e também da análise do polimorfismo I/D da ECA. As tabelas 6 e 7 exibem análise comparativa entre grupos, respectivamente.

Tabela 6. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo do TNF-308, comparando pacientes do estágio A com o estágio C

Genótipo	GRUPO A N = 100 N(%)	GRUPO C N = 98 N(%)	OR (IC 95%)	p valor	OR* (IC 95%)	p valor *
GG	78 (78)	81 (83)	- Referência -			
GA	21 (21)	16 (16)	0,7 (0,4 – 1,5)	0,40	1,0 (0,4 – 2,3)	0,98
AA	1 (1)	1 (1)	1,0 (0,1 – 15,7)	0,98	2,2 (0,1 – 75,3)	0,67
Alelo G	177 (88)	178 (91)	- Referência -			
Alelo A	23 (12)	18 (9)	0,8 (0,3 – 2,0)	0,59	1,1 (0,4 – 3,1)	0,92

*Valores de OR corrigidos para gênero, idade e uso de benznidazol

IC = Intervalo de confiança

Teste de Cochran Armitage para dose alélica $p = 0,700$

Tabela 7. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo da ECA, comparando pacientes do estágio A com o estágio C

Genótipo	GRUPO A N = 100 N(%)	GRUPO C N = 98 N(%)	OR (IC 95%)	p valor	OR* (IC 95%)	p valor *
DD	31 (0,31)	37 (0,37)	- Referência -			
DI	43 (0,43)	50 (0,51)	0,97 (0,52 – 1,81)	0,94	0,88 (0,45 – 1,72)	0,70
II	26 (0,26)	12 (0,12)	0,39 (0,17 – 0,89)	0,03	0,43 (0,18 – 1,04)	0,06
Alelo D	105 (0,52)	124 (0,63)	- Referência -			
Alelo I	95 (0,48)	74 (0,37)	0,66 (0,38 – 1,16)	0,15	0,68 (0,37 – 1,25)	0,21

* Valores de OR corrigidos para gênero, idade e uso de benznidazol

IC = Intervalo de confiança

Teste de Cochran Armitage para dose alélica $p = 0,05$

4.3 Análise de concentrações séricas de TNF: perfil e comparação quanto aos grupos analisados, fração de ejeção e uso de medicamentos

Foi possível a realização das dosagens do TNF em 122 pacientes. O perfil do grupo estudado apresenta 69 (56,6%) portadores do estágio A e 53 (43,4%) do estágio C, predominância feminina. De forma esperada, os grupos apresentam distinta diferença no valor da FEVE, conforme demonstrado na tabela 8.

Tabela 8. Características clínicas quanto aos grupos analisados da dosagem sérica do TNF

Variáveis	Total (N = 122)	Grupo A (N = 69)	Grupo C (N = 53)	p-valor
SEXO				
Feminino	82 (67,2%)	50 (72,5%)	32 (60,4%)	0,159
IDADE				
Média (DP)	53,9 (12,5)	50,1 (12,1)	58,9 (11,4)	<0,001
FEVE				
Média (DP)	54,2 (15,8)	66,8 (5,1)	38,1 (8,3)	<0,001

Os níveis de TNF foram bastante dispersos. Avaliando a distribuição dos valores da dosagem, consegue-se subdividir o grupo entre altos (níveis acima de 3,09 pg/mL) e médios (níveis entre 1,098 e 3,08 pg/mL). Nosso ensaio não foi capaz de detectar níveis de TNF em todas as amostras, o que pode revelar níveis muito baixos ou perda da citocina na manipulação da amostra. Dessa forma, decidimos retirar das análises deste estudo valores inferiores aos da mediana (1,097 pg/mL).

Os dados mostrados no gráfico 1 indicam que portadores de DCh em estágio C apresentam níveis significativamente elevados de TNF sérico quando

comparados a controles não infectados (NI). No entanto, não houve diferença entre os portadores da DCh, classificados como estágio C, comparados a portadores em estágio A.

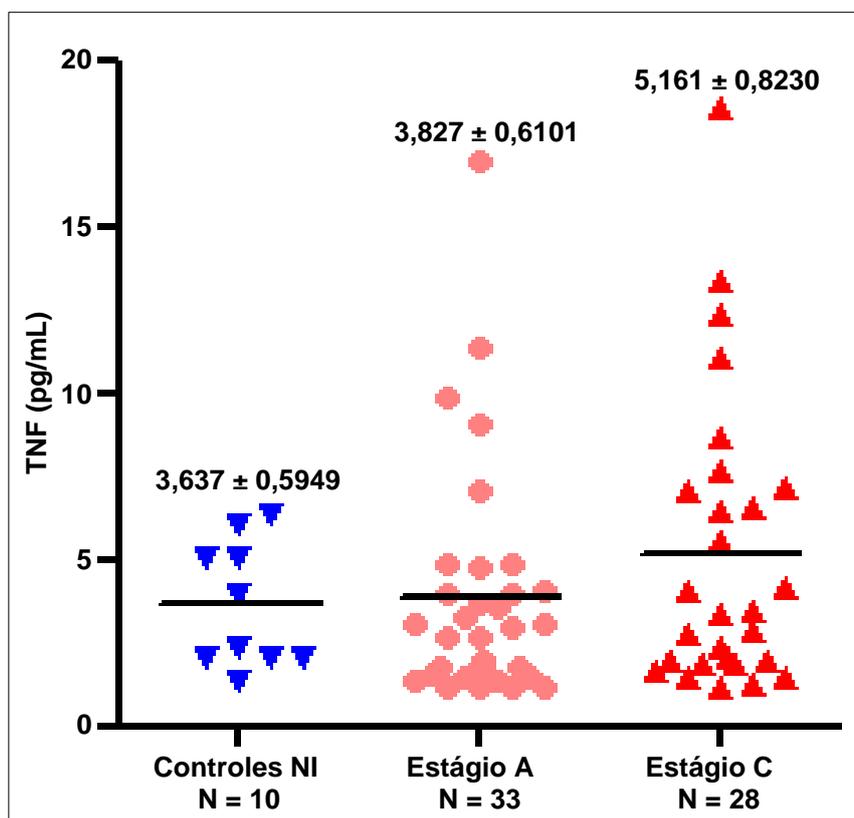


Gráfico 1. Níveis séricos de TNF de portadores de infecção pelo *T. cruzi* classificados em estágios A e C em comparação a controles não infectados (NI). $p = 0,0123$ (controle NI x estágio C)

O gráfico 2 mostra os níveis séricos de TNF em controles NI e portadores da DCh em estágio A em comparação com o estágio C, os quais encontram-se estratificados de acordo com os valores de FEVE. A comparação dos níveis de TNF sérico no estágio C, em diferentes níveis de FEVE, não exibem diferença. Contudo, níveis mais elevados de TNF foram encontrados nos pacientes do estágio C que apresentam FEVE <40%, quando comparados a controles NI.

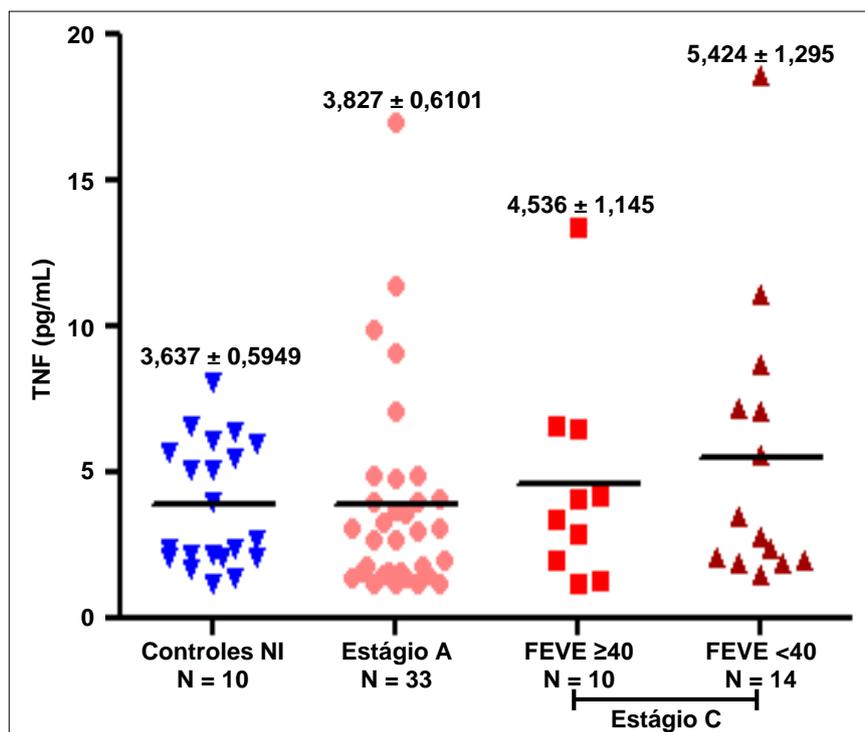


Gráfico 2. Níveis séricos de TNF de portadores de infecção pelo *T. cruzi* classificados em estágios A e C, estratificados por valores da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, em comparação a controles não infectados. $p = 0,0010$ (controles NI x estágio C: FEVE <40%)

Não foi demonstrada correlação significativa entre os níveis séricos de TNF e a FEVE dos portadores da DCh avaliados. No entanto, houve correlação inversa ($R^2 = 0,04218$), porém sem significado estatístico.

Independente do estágio clínico, foram analisados os níveis de TNF em soro de portadores da DCh (em estágios A e C) em função dos genótipos GG e GA do polimorfismo TNF-308. Nossos dados indicam que não há diferença significativa nos níveis séricos de TNF dos portadores dos genótipos GG e GA (gráfico 3).

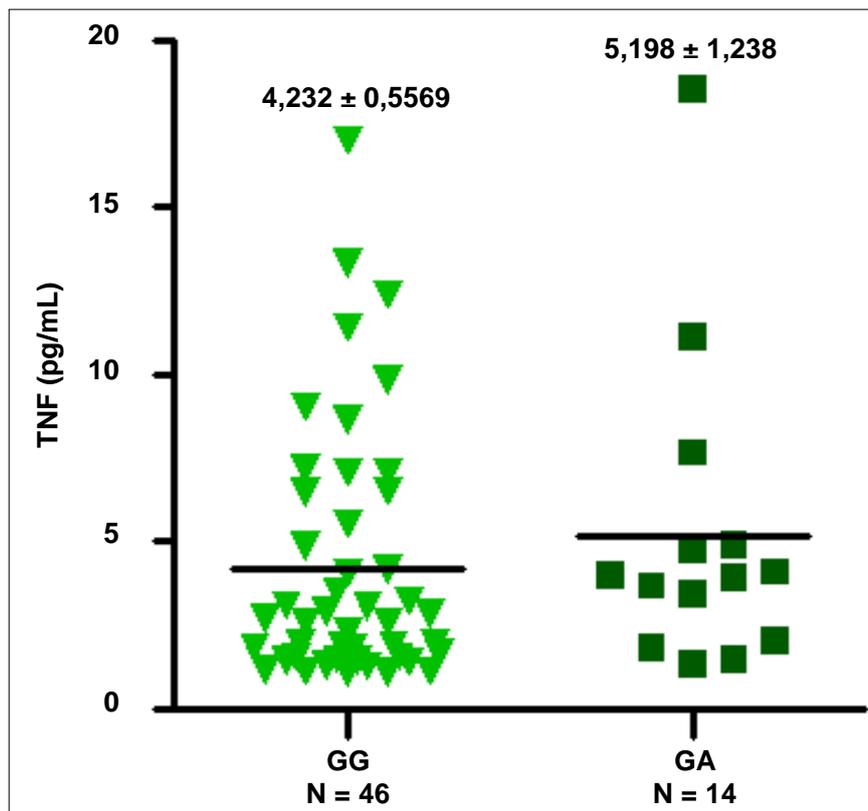


Gráfico 3. Níveis séricos de TNF de portadores de infecção pelo *T. cruzi* classificados quanto à expressão dos genótipos GG e GA do polimorfismo TNF-308

5. DISCUSSÃO

5.1 Marcadores genéticos

Baseadas na diversidade de apresentações clínicas, encontradas entre portadores de DCh e estudos de suscetibilidade genética a doenças infecciosas, diversas publicações caracterizaram genes associados ao desenvolvimento ou progressão para diferentes apresentações relacionadas. No presente estudo, foi avaliado o papel dos polimorfismos genéticos no desenvolvimento de formas clínicas na DCh, em uma população do Nordeste brasileiro.

As múltiplas faces, que envolvem a tríade parasita – ambiente – hospedeiro, apresentam interação complexa e devem estar envolvidas no amplo espectro de apresentações clínicas da DCh. De longa data, publicações vêm tentando vencer o desafio e identificar ferramentas que sinalizem o destino dos portadores da doença. Em 1985, foi assinalado o valor do ECG e da classe funcional no momento do diagnóstico da DCh⁶². Espinosa e colaboradores, após seguimento de uma década, chamaram atenção ao presumível dano miocárdico naqueles com ECG anormal e sugeriram que inúmeras variáveis, incluindo níveis de pressão sistólica, aumento da área cardíaca e da pressão diastólica final do VE, estão inversamente relacionadas à sobrevida²⁸. Mady e colaboradores reiteraram o valor da classe funcional da IC como um forte preditor, além de outros parâmetros laboratoriais, como VO₂ máximo e FEVE²⁹. Em 2006, Rassi Jr. e colaboradores apresentaram elaborado escore para a predição de risco de morte no contexto da DCh³¹. Apesar do inegável valor dessa pesquisa, ainda é necessário rever algumas variáveis. Esse mesmo

autor posteriormente chama atenção para a diversidade dos fatores de risco indicados nas publicações e ressalta que muitos artigos relacionados envolvem desenhos, análises estatísticas e desfechos distintos, gerando conclusão com limitado grau de confiança³².

O presente estudo abordou, em modelo de caso-controle, uma população em sua totalidade de região endêmica para a DCh, natural do Nordeste brasileiro, com baixos indicadores sócio-econômico-culturais, padrão habitual, compatível com o perfil de pobreza, inerente ao cenário que envolve a doença⁶³.

As mulheres predominaram em nossa amostra. A variável sexo parece ter importância prognóstica na doença, sendo que os homens apresentaram maior risco de morte em algumas avaliações^{31,64}, embora com discordância em outras⁶⁵. Em nossa população, há homogeneidade entre os estágios A e C comparados quanto ao número de mulheres envolvidas.

Quanto à naturalidade, há distinções entre os grupos. Portadores da classificação em estágio “A” apresentam maior equivalência entre macrorregiões de Pernambuco, enquanto os pacientes em estágio “C” são mais prevalentes na Zona da Mata, região que, no passado, foi de alta endemicidade para DCh⁶⁶. Comportamento distinto também é observado quanto à procedência, 51% dos portadores de IC – estágio C – residem na região Metropolitana de PE, apesar de não serem naturais da mesma região. É possível propor que entre as possíveis causas da “urbanização” desse grupo grave esteja o fator da busca por melhores condições de vida e maior acesso aos serviços de saúde especializados na região metropolitana do estado.

Entre as comorbidades, a HAS é a mais frequente, atingindo mais de 1/3 da população, enquanto que a diabetes foi encontrada em menos de 10%, ambos com valores próximos aos encontrados no estudo “*Interheart América Latina*”⁶⁷. Os grupos são homogêneos também em relação a esses fatores de risco, não exibindo diferença estatística, apesar de maior frequência absoluta na de HAS no grupo de portadores em estágio C, quando comparado ao grupo em estágio A.

Os pacientes portadores de IC – grupo C – estavam recebendo terapia “ótima” de acordo com orientação da “I Diretriz para o tratamento da Cardiopatia Chagásica”²⁷, com uso de BB em percentuais acima de relatos em outras publicações envolvendo IC de etiologia Chagásica e doses semelhantes de IECA/BRA^{26, 68}.

Segundo Childs, há influência dos genes na etiologia e na patogenia de qualquer que seja a anormalidade da fisiologia ou do comportamento humano e exemplifica que até mesmo a mais “ambiental” das causas depende, de certo modo, da resposta do organismo que, por sua vez, depende do genótipo⁶⁹. Reiteramos que Pasteur também já considerava a importância da hereditariedade na susceptibilidade à infecção, valorizando características genéticas não só do hospedeiro como dos patógenos envolvidos⁴².

Na busca por identificar ferramentas úteis na predição de desfechos clínicos, foram utilizados, na nossa avaliação, biomarcadores moleculares, genes candidatos, priorizando aqueles cujo papel biológico seja relevante, quer seja na resposta imune (polimorfismo do TNF) quer no mecanismo relacionado ao sistema renina-angiotensina-aldosterona. Este é um sistema complexo, que

influencia a homeostase do sal e da água, modula a fibrose miocárdica e atua no tônus vascular (polimorfismo I/D da ECA).

Na DCh, os estudos de polimorfismo gênico de moléculas envolvidas na resposta imune durante a infecção pelo *T. cruzi* têm sido executados em diversas populações, exibindo interessantes conclusões. Vários polimorfismos têm sido investigados, incluindo os das interleucinas, linfotoxinas e quimiocinas^{46,70-72}.

O polimorfismo do TNF está entre um dos mais avaliados na DCh. O gene codificante para TNF está localizado na região do MHC classe III, do cromossoma 6 humano, contendo vários sítios polimórficos⁷³. Vários ensaios foram realizados para verificar a associação entre variantes gênicas do promotor de TNF, comparando portadores de DCh assintomáticos, sintomáticos graves ou não à população saudável. A avaliação da frequência dos polimorfismos -308, -244 e -238 na região promotora do TNF, em um pequeno grupo de pacientes peruanos portadores da DCh não demonstrou associação desses polimorfismos com a cardiopatia, quando pacientes com CCC⁷⁴. O estudo incluiu, na sua totalidade, apenas 85 soropositivos para a infecção pelo *T. cruzi*, subdivididos entre pacientes com e sem cardiopatia. Outras informações relevantes, como comorbidades e função ventricular, não foram apresentadas, limitando demasiadamente a interpretação^{68,74}.

Em oposição, estudo em mexicanos mostrou aumento da frequência do alelo TNF-308A nos portadores de CCC quando comparados a portadores assintomáticos, concluindo que, naquela população, o alelo A poderia ser diretamente envolvido na susceptibilidade genética à expressão com maior

comprometimento clínico da CCC. De forma, ainda, mais restrita, os autores incluíram, apenas, 54 portadores de DCh, distintos, apenas, pela área cardíaca na radiografia de tórax, se normal ou aumentada, e compararam com 169 pessoas da população com sorologia negativa para infecção pelo *T. cruzi*. Os autores ressaltaram o valor do alelo A entre portadores de DCh e a correlação desse alelo com a alta produção de TNF. Também salientaram que o genótipo GG esteve relacionado com resistência⁵⁷. Entretanto, em nosso estudo, não observamos a proteção desse genótipo. A presença do alelo A não conferiu maior risco no desenvolvimento da forma grave da doença. Tal discordância pode ser explicada pela reduzida amostra do estudo mexicano, por características da população ou por diversidades genômicas.

No Brasil, Drigo e colaboradores apresentaram redução de sobrevida quando encontrada a presença do alelo TNF-308A ou do alelo do microssatélite TNFa2, avaliando 42 pacientes com FEVE $\leq 40\%$, e acompanhados por um período médio de 26,8 meses⁴⁸. O mesmo grupo, 1 ano após, comparou 2 grupos portadores de *T. cruzi* positivos, parte assintomáticos e outro, incluindo diferentes graus de disfunção ventricular e não comprovou associação entre o polimorfismo do TNF-308 e as apresentações clínicas⁴⁹.

É interessante considerar a semelhança entre o perfil genotípico encontrado na população de Drigo e colaboradores e a nossa população estudada, como o predomínio do genótipo GG. É provável que nos pacientes envolvidos, mesmo tendo sido incluídos em São Paulo, parte deles pode ser natural da região Nordeste, justificando tal fato. Assim, também como concluído

neste estudo, o nosso trabalho não mostrou associação positiva entre a genotipagem do TNF-308 e as formas clínicas da doença.

No Triângulo Mineiro, Pissetti e colaboradores estudaram portadores de DCh e compararam a não portadores da infecção pelo *T. cruzi*. Identificaram associação à infecção, quando analisado o polimorfismo TNF-238. Também foi avaliado polimorfismo na posição TNF-308, o qual não demonstrou relação com a doença. Foram incluídos 300 pacientes; apenas 56% eram sorologicamente positivos para a infecção pelo *T. cruzi* os quais não foram classificados clinicamente. Também não foi realizada a genotipagem em sua totalidade. Dessa forma, o estudo finalizou com amostra muito reduzida para as análises, concluindo que a ausência do alelo A na posição -238 estava associado à não infecção pelo *T. cruzi*. Também demonstrou que indivíduos com alelo TNF-238A produzem altos níveis de TNF⁵⁰. Em nosso estudo, direcionamos a análise para o TNF-308 e, em concordância com Pissetti, também não encontramos relação com o desenvolvimento da doença cardíaca. Entretanto, chamamos atenção para importantes limitações do estudo de Pissetti, não só do número de análises genotípicas como também da avaliação clínica realizada (apenas 55%).

Mais recentemente, estudo na Colômbia concluiu que o TNF-308 pode influenciar na susceptibilidade ao desenvolvimento da CCC, envolvendo mais de 300 pacientes portadores de DCh, parte do grupo assintomático com ECG normal, e o restante apresentando alterações elétricas e/ou estruturais. Em nossa avaliação, a separação entre caso e controle foi rigorosa. Consideramos inadequado incluir pacientes com e sem disfunção ventricular no mesmo grupo.

A função ventricular entre portadores de CCC é reiteradamente citada como um forte preditor de risco³². Os autores concluem que os portadores do TNF-308A têm alto risco para desenvolver miocardiopatia chagásica crônica⁵⁸. Mais uma vez, encontramos diferença com os nossos resultados. Questões metodológicas e ou diferenças regionais genótípicas podem justificar.

Um fator que é identificado como relevante em uma população pode não se repetir em outra; diferenças interindividuais e estilo de vida podem estar envolvidos⁷⁷. Quando comparada a frequência genotípica do TNF-308 nas distintas populações anteriormente comentadas, há expressiva diferença entre elas ($p=0,006$), incluindo países da América do Sul e três estudos brasileiros: um oriundo de São Paulo, outro de Minas Gerais e o nosso. A amostra aqui avaliada chama atenção pela aproximação com os dados do estudo do Peru (1998)⁷⁴ e, de forma muito especial, com o estudo desenvolvido em São Paulo (2007)⁴⁹. As populações do México (2005)⁵⁷, da Colômbia (2012)⁵⁸ e de Minas Gerais apresentaram percentual maior de pacientes com o alelo A, especialmente a do México.

Quando agrupamos os resultados de forma mais didática, é possível visualizar que estudos os quais demonstraram associação do polimorfismo do TNF-308 pertencem aos que têm genotipagem “semelhante”; no nosso, que se aproxima dos dados dos estudos realizados em São Paulo, e no do Peru, não foi comprovada essa relação.

Tabela 9. Estudos desenvolvidos em DCh e polimorfismo TNF-308

População/ Publicação	Grupos avaliados	Associação
Peru - 1998	<i>T. cruzi</i> (+) X <i>T. cruzi</i> (-)	Ausência de associação
México - 2005	<i>T. cruzi</i> (-) X <i>T. cruzi</i> (+)	Susceptibilidade
Brasil - 2007 São Paulo	<i>T. cruzi</i> (+) Assintomáticos X CCC	Ausência de Associação
Colômbia – 2012	<i>T. cruzi</i> (+) CCC X Assintomáticos	Susceptibilidade
Pernambuco - 2015	CCC (estágio A X estágio C)	Ausência de associação

Consideramos que os diferentes grupos étnicos podem levar à variação da frequência de distintos marcadores de acordo com a estrutura da população e a etnia. Logo, diferenças genéticas interindividuais podem levar a diversos perfis de risco, podendo ser uma das justificativas para a discordância dos resultados. Somam-se a isso amostras reduzidas, especialmente nos estudos de associação, com poder inadequado para identificar contribuições genéticas discretas. A interação gene-ambiente pode também justificar os diferentes resultados. Fenótipos finais, algumas vezes, são vistos na dependência de fatores ambientais⁷⁵.

Análise multivariada, previamente publicada entre portadores de DCh⁴⁸, demonstrou o risco aumentado entre pacientes que apresentaram quadro clínico de IC anterior aos 46 anos. Algumas hipóteses têm sido propostas no desenvolvimento, de forma grave, em idade mais jovens, além da predisposição genética. A persistência em área rural (possibilidade de

reinfecções frequentes), habitação e assistência médica inadequada, podem ser fatores importantes nesse contexto. Nossa análise estatística considerou o fator idade e realizou estudo com ponderação dessa variável, além do gênero e uso do benznidazol. Ainda assim, nada agregou à análise geral. Não foi obtido nenhum resultado positivo quanto à correlação com a forma clínica, quando analisado o estudo genotípico ou por alelos do TNF-308 em nossa população.

De forma distinta aos mediadores relacionados a polimorfismos imunológicos, a avaliação genética da ECA se mostra de fundamental importância no que se refere às miocardiopatias, de etiologia chagásica ou não. O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é compreendido por um sistema complexo relacionado à homeostase hidroeletrolítica do organismo, ao controle da pressão arterial e à modulação da fibrose miocárdica. A angiotensina II (AII) é a responsável pela maioria dos efeitos fisiológicos. Técnicas modernas permitiram identificar muitos componentes do SRAA em tecidos periféricos, renina, ECA e receptores de AII, em vários tecidos, como glândulas adrenais, rins, coração, vasos e cérebro, comprovando a existência de SRAA local. A partir dos anos 1990, iniciou-se a identificação de vários polimorfismos do SRAA, entre eles o polimorfismo I/D do gene da ECA. Este corresponde à inserção (I) ou deleção (D) de 287 pares no íntron 16 do gene da ECA⁷⁶.

Vários estudos foram desenvolvidos e apresentaram relação entre a concentração sérica da ECA e o genótipo individual. Assim, os portadores do genótipo D/D teriam as maiores concentrações, enquanto que os II teriam as menores concentrações séricas de ECA^{77,78}. Estima-se que o alelo D

contribuiria com aproximadamente metade da variação dos níveis plasmáticos da ECA⁷⁹. Apesar de algumas discordâncias, o genótipo DD tem sido associado com maior risco de IC e mortalidade⁵³. Avaliação entre portadores de IC de etiologia idiopática demonstrou, em estudo de coorte, que o genótipo DD manteve-se como preditor de morte na análise multivariada, sugerindo a importância desse perfil genotípico como influente fator na redução de sobrevida entre portadores de IC⁵². De fato, a avaliação do perfil genético na IC, incluindo diversas etiologias, parece-nos ainda incompleta. A literatura é repleta de resultados conflitantes, permanecendo intenso o debate sobre a existência e quais seriam os polimorfismos implicados na susceptibilidade para o desenvolvimento ou agravamento do quadro^{52,80,81}.

Em relação à população portadora da DCh, uma única publicação relata avaliação realizada na população venezuelana. Todas as análises são apresentadas a partir do padrão genotípico, que se apresenta distinto do nosso estudo, especialmente pela menor proporção de genótipos II na nossa população⁵⁶. Em relação ao presente estudo, a análise venezuelana apresentava amostra de menor número, reduzida informação da condição clínica e FEVE média do grupo em 55% (sem distinção do valor entre grupos). Em nosso estudo foi realizada classificação clínica sistematizada (respeitando as definições em estágio A ou C), além dos portadores de IC serem avaliados por critérios clínicos e apresentarem, nos resultados finais, a FE média <40%. Apesar das diferenças no desenho dos dois estudos, ambos concluíram a ausência de associação entre o estudo genotípico da ECA I/D e as formas clínicas da DCh⁵⁶. No entanto, nosso grupo demonstrou proteção do genótipo

II, com frequência duplicada entre pacientes do estágio A e significância na análise estatística, embora não tenha conseguido manter esta expressão quando ajustado para variáveis como idade, gênero e tratamento com benznidazol. Na nossa análise, não houve associação relevante entre o estudo com alelos. Pascuzzo-Lima e colaboradores observaram números distintos quando analisados por alelos. O alelo D apresentou tendência a grau avançado de miocardiopatia chagásica, no entanto não atingiu significância estatística⁵⁶.

Considerações sobre a interação farmacogenética com o polimorfismo ECA I/D também vêm sendo discutidas. McNamara e colaboradores, em estudo de coorte, observaram entre pacientes com IC sistólica, que o alelo D esteve associado à evolução desfavorável, sendo o impacto observado apenas no grupo não tratado com IECA e BB, sugerindo, assim, uma potencial interação farmacogenética entre o polimorfismo I/D e a terapia. Pacientes submetidos ao bloqueio neuro-humoral não apresentaram expressão clínica com base no perfil genotípico^{82,83}. Em nossa população, aproximadamente 88% dos pacientes do estágio C e 25% do A estavam em uso de drogas bloqueadoras do sistema neuro-humoral. É possível que também essa interação tenha influenciado na ausência de associação. Não seria possível, na nossa análise, realizar essa verificação de forma isolada, devido ao reduzido número de pacientes no grupo C que não fazem uso de nenhum dos medicamentos envolvidos.

Outras considerações são relevantes para se explicar a alta discordância da literatura entre os estudos, envolvendo estudo de associação em genética. São necessárias grandes amostras para demonstrar os efeitos

dos genes envolvidos em traços complexos⁸⁴, pertinente colocação, quando tratamos de uma síndrome clínica como a IC, paradigma de complexidade e de via final de patologias outras – fenótipos intermediários. Em que pese o valor de outras variáveis úteis na avaliação clínico-laboratorial, como padrão de remodelamento cardíaco, dimensões de câmaras cardíacas, optamos por não realizá-las, partindo da premissa de que a utilização de múltiplas variáveis na análise tem grande chance de gerar associações espúrias. Mantemos, assim, a análise por desfecho significativo, IC ou forma sem cardiopatia aparente entre portadores da infecção pelo *T. cruzi*.

Com o avanço das pesquisas na área de genética humana e a publicação do sequenciamento do genoma humano (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004), foi desenvolvido o Projeto Internacional HapMap (*The International HapMap Consortium*, 2005), que promove estudos com amostras de grande amplitude, utilizando a tecnologia GWAS - *Genome wide associate study* – o que gera informações consistentes e relevantes. Estudos já publicados com GWAS na DCh observaram a inexistência de SNPs altamente associados com CCC, considerando, entretanto, que maiores amostras provavelmente irão detectar polimorfismos úteis na avaliação prognóstica na DCh e promover informações mais definitivas⁸⁵.

5.2 TNF como marcador inflamatório

Na DCh, o TNF apresenta distintos papéis nas diferentes fases, aguda e crônica, motivando interessantes pesquisas na área. Estudos prévios apresentaram concordância entre o aumento nos níveis séricos de TNF e a gravidade da CCC^{39,86}.

Na nossa amostra, os valores do TNF encontrados estiveram distintos, de forma significativa, dos pacientes com sorologia negativa para infecção pelo *T. cruzi*. No entanto, entre portadores de DCh, não houve distinção entre estágios. O achado do aumento dos níveis de TNF entre portadores de DCh, mesmo na forma sem cardiopatia aparente, já havia sido registrado. Ferreira e colaboradores demonstraram importante diferença quando compararam portadores de DCh, com e sem disfunção ventricular⁸⁶. Na nossa amostra, a aproximação dos níveis de TNF, encontrados no soro, entre portadores de DCh pode ser devido a que os pacientes em estágio C, de forma geral, estarem em uso de tratamento com bloqueio neuro-hormonal, em fase “compensada” da doença. Essa justificativa pode ser auxiliada também quando incluímos a análise estratificada pela FE; ao recorrermos a outro parâmetro de gravidade (FEVE), o impacto é maior quando comparado a NI, registrando-se então significância estatística.

Analisando-se a correlação entre os níveis de TNF e a FEVE, evidenciou-se correlação inversa, porém não significativa. Logo, quanto menor a FEVE, maiores os níveis de TNF. Mesmo com fragilidade estatística, é possível considerar a importância do TNF como indicador do estado

inflamatório em pacientes com quadros mais avançados de remodelamento cardíaco.

Quando avaliamos se os níveis de TNF poderiam ser associados ao genótipo do SNP *TNF*-308 assim como em outro relato brasileiro⁵⁰, não observamos nenhuma relação entre o padrão genotípico e os valores plasmáticos de TNF no soro.

5.3 Limitações

A principal limitação de nosso estudo é o número de pacientes menor que o atualmente indicado para estudo populacional genético. Mesmo assim, é pioneiro na análise, incluindo pacientes exclusivamente naturais da região Nordeste, além de ter, em seu desenho, estratificação clínica claramente definida.

5.4 Considerações finais e implicações clínicas

O presente estudo foi idealizado com base na diversidade de apresentações clínicas na DCh, cotejando-se perfis clínicos de pacientes com qualidade e quantidade de vida semelhantes à população normal não infectada e portadores de IC em sua forma grave.

Tratando-se de doença negligenciada, houve grande motivação na busca por ferramentas possíveis de serem incorporadas à prática clínica em

nosso ambulatório e que tornasse possível identificar precocemente esses potenciais pacientes graves e intervir de forma mais agressiva. O convívio com a dor e a história de vida dessa população constituem a alavanca motivacional do presente estudo.

Apesar de o biomarcador genético não ter se mostrado útil nessa análise, a avaliação clínica dos pacientes de forma sistemática, a elaboração e a discussão dos casos, as hipóteses geradas com a análise de marcador e o uso de drogas bem como a interação entre as instituições envolvidas, agregando diversos segmentos de saber, trouxeram enorme benefício ao Ambulatório de Referência em Doença de Chagas do Estado de Pernambuco.

Assim, se, de uma parte, uma resposta positiva à pergunta condutora do estudo não foi obtida, de outra parte, conseguiu-se alcançar, com grande grau de certeza, a resposta negativa do uso dos polimorfismos genéticos escolhidos na predição de desfecho clínico na DCh. Por certo, em tal conclusão, reside o mérito e contributo do presente trabalho.

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo revelou que os polimorfismos genéticos TNF-308 e ECA I/D não se mostram úteis como preditores de formas clínicas entre pacientes com DCh na população do Nordeste brasileiro.

7. REFERÊNCIAS

1. Chagas CRJ. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909;1(2):159-219.
2. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(7):2034–9.
3. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. Updated March 2014 - World Health Organization [Internet] [Acesso em 15.07.2014]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
4. Hotez PJ, Dumonteil E, Betancourt Cravioto M, Bottazzi ME, Tapia-Conyer R, Meymandi S, Karunakara U, Ribeiro I, Cohen RM, Pecoul B. An unfolding tragedy of chagas disease in north america. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(10):e2300.
5. Albajar-Vinas P JJ. Chagas disease in Europe Special edition: Euro Surveill. 2011;16(38).[Acesso em 20.11.2013]. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19968>
6. Yasukawa K. Blood donor screening for *Trypanosoma cruzi* infection in Japan. *Transfusion*. 2014;54(3):745–6.
7. Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(4):655–81.
8. Hotez PJ. Neglected infections of poverty in the United States of America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(6):e256.

9. Cruz-Reyes A, Pickering-López JM. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(4):345–54.
10. Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol*. 2014;103(1):1–10.
11. Alves Jr WO. Forma Indeterminada da doença de Chagas. Avaliação através do teste ergométrico. [Dissertação - Mestrado] Universidade Federal de Pernambuco;1987.
12. Silva AC. O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América - História de uma iniciativa internacional. 2002 p. Pan American Health Organization – Washington – USA [Acesso em 10.03.2014]. Disponível em file:///C:/Users/Silvia/Downloads/chagas_100_anhos_esp.pdf
13. Coura J. O falso dilema sobre a luta antivetorial e as perspectivas de controle da doença de Chagas no Brasil. BHC ou BNH? *Cad Saude Pública*. 1993;9:514–8.
14. Martins-Melo FR, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Trop*. 2013;1–8.
15. Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos AN, Heukelbach J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2):e1508.
16. Ostermayer AL, Passos AD, Silveira AC, Ferreira AW, Macedo V, Prata AR. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(Suppl 2):108–21.

17. Dias JCP. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern Region, Brazil. *Cad Saude Pública*. 2000;16:13–34.
18. Frade AF, Pissetti CW, Ianni BM, Saba B, Lin-Wang HT, Nogueira LG, de Melo Borges A, Buck P, Dias F, Baron M, Ferreira LR, Schmidt A, Marin-Neto JA, Hirata M, Sampaio M, Fragata A, Pereira AC, Donadi E, Kalil J, Rodrigues V, Cunha-Neto E, Chevillard C. 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.
19. Oliveira Jr W de. All-around care for patients with Chagas disease: a challenge for the XXI Century. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(Suppl):181–6.
20. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388–402.
21. Silva AA, Vilar-Pereira G, Souza SA, Silva RR, Rocha SM, Lannes-Vieira J. Trypanosoma cruzi-induced central nervous system alterations: from the entry of inflammatory cells to potential cognitive. *J Neuroparasitology*. 2010;1:1–13.
22. Ribeiro ALP, Rocha MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31(3):301–14.
23. Chagas CRJ. Pathogenic processes of American Trypanosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1916;8:3–34.
24. Dias JCP. História natural da doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol*. 1995;65(4):359–66.

25. Sabino EC, Ribeiro AL, Salemi VMC, Di Lorenzo Oliveira C, Antunes AP, Menezes MM, Ianni BM, Nastari L, Fernandes F, Patavino GM, Sachdev V, Capuani L, de Almeida-Neto C, Carrick DM, Wright D, Kavounis K, Gonzalez TT, Carneiro-Proietti AB, Custer B, Busch MP, Murphy EL; National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), International Component. Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation*. 2013;127(10):1105–15.
26. Pereira Nunes MDC, Barbosa MM, Ribeiro ALP, Amorim Fenelon LM, Rocha MOC. Predictors of mortality in patients with dilated cardiomyopathy: relevance of chagas disease as an etiological factor. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63(7):788–97.
27. Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AAV, Vilas-Boas F, Oliveira GMM, Bacal F, Bocchi EA, Almeida DR, Fragata Filho AA, Moreira MCV, Xavier SS, Oliveira Jr W A, Dias JCP, et al. I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(2 Supl.3):1–48.
28. Espinosa RA, Pericchi LR, Carrasco HA, Escalante A, Martínez O, González R. Prognostic indicators of chronic chagasic cardiopathy. *Int J Cardiol*. 1991;30(2):195–202.
29. Mady C, Cardoso RHA, Barretto AC, da Luz PL, Bellotti G, Pileggi F. Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy. *Circulation*. 1994;90:3098–102.
30. Viotti RJ, Vigliano C, Laucella S, Lococo B, Petti M, Bertocchi G, Ruiz Vera B, Armenti H. Value of echocardiography for diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease cardiomyopathy without heart failure. *Heart*. 2004;(90):655–60.

31. Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, Hasslocher-Moreno A, Sousa AS, Scanavacca MI. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med*. 2006;355(8):799–808.
32. Rassi A, Rassi SG. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation*. 2007;115(9):1101–8.
33. Hidron A, Vogenthaler N, Rodriguez-morales AJ, Franco-Paredes C, Rassi A. Cardiac involvement with parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(2):324–49.
34. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007;115(9):1109–23.
35. Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med*. 2008;8(6):510–8.
36. Lannes-Vieira J, Silverio JC, Pereira IR, Vinagre NF, Carvalho CM, Paiva CN, Silva da AA. Chronic Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors - how to make a dream come true. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(Suppl.1):226–35.
37. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e29.
38. Machado FS, Tanowitz HB, Ribeiro AL. Pathogenesis of chagas cardiomyopathy: role of inflammation and oxidative stress. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(5):e000539.

39. Talvani A, Rocha MOC, 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(7):943–50.
40. Lannes-Vieira J, Pereira IR, Vinagre NF, Arnez LE. TNF-alpha and TNFR in Chagas disease: from protective immunity to pathogenesis of chronic cardiomyopathy. *Adv Exp Med Biol*. 2011;691:221–30.
41. Cunha-Neto E, Nogueira LG, Teixeira PC, Ramasawmy R, Drigo SA, Goldberg AC, Fonseca SG, Bilate AM, Kalil J. 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.
42. Casanova J, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(1):55–66.
43. Ramasawmy R, Fae KC, Cunha-Neto E, Müller NG, Cavalcanti VL, Ferreira RC, Drigo SA, Ianni B, Mady C, Goldberg AC, Kalil J. Polymorphisms in the gene for lymphotoxin-alpha predispose to chronic Chagas cardiomyopathy. *J Infect Dis*. 2007;196(12):1836–43.
44. Ramasawmy R, Faé KC, Cunha-Neto E, Borba SCP, Ianni B, Mady C, Goldberg AC, Kalil J. Variants in the promoter region of IKBL/NFKBIL1 gene may mark susceptibility to the development of chronic Chagas' cardiomyopathy among *Trypanosoma cruzi*-infected individuals. *Mol Immunol*. 2008;45(1):283–8.
45. Dias FC, Medina TDS, Mendes-Junior CT, Dantas RO, Pissetti CW, Rodrigues Junior V, Dellalibera-Joviliano R, Marin-Neto JA, Gutierrez FR, Moreau P, Silva JS, Donadi EA. Polymorphic sites at the immunoregulatory CTLA-4 gene are associated with chronic Chagas disease and its clinical manifestations. *PLoS One*. 2013;8(10):e78367.

46. Frade AF, Teixeira PC, Ianni BM, Pissetti CW, Saba B, Wang LHT, Kuramoto A, Nogueira LG, Buck P, Dias F, Giniaux H, Llored A, Alves S, Schmidt A, Donadi E, Marin-Neto JA, Hirata M, Sampaio M, Fragata A, Bocchi EA, Stolf AN, Fiorelli AI, Santos RH, Rodrigues V, Pereira AC, Kalil J, Cunha-Neto E, Chevillard C. Polymorphism in the alpha cardiac muscle actin 1 gene is associated to susceptibility to chronic inflammatory cardiomyopathy. *PLoS One*. 2013;8(12):e83446.
47. Ayo CM, Dalalio MMDO, Visentainer JEL, Reis PG, Sippert EA, Jarduli LR, Alves HV, Sell AM. 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;2013:284729.
48. Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Cardoso MR a, Braga PE, Faé KC, Nunes VL, Buck P, Mady C, Kalil J, Goldberg AC. TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Microbes Infect*. 2006;8(3):598–603.
49. Drigo SA, Cunha-Neto E, Ianni B, Mady C, Faé KC, Buck P, Kalil J, Goldberg AC. Lack of association of tumor necrosis factor-alpha polymorphisms with Chagas disease in Brazilian patients. *Immunol Lett*. 2007;108(1):109–11.
50. Pissetti CW, Correia D, de Oliveira RF, Llaguno MM, Balarin MAS, Silva-Grecco RL, Rodrigues V Jr. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development Trypanosoma cruzi infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e976.
51. Fernández-Solà J, Nicolás JM, Oriola J, Sacanella E, Estruch R, Rubin E, Urbano-Márquez A. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with vulnerability to alcoholic cardiomyopathy. *Ann Intern Med*. 2002;137(5 Part 1):321-6.

-
52. Andersson B, Sylvén C. The DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with increased mortality in idiopathic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28(1):162–7.
 53. Albuquerque FN, Brandão AA, Silva DA Da, Mourilhe-Rocha R, Duque GS, Gondar AFP, Neves LM, Bittencourt MI, Pozzan R, Albuquerque DC. Angiotensin-converting enzyme genetic polymorphism. *Arq Bras Cardiol.* 2014;102(1):70-9.
 54. Montgomery HE, Keeling PJ, Goldman JH, Humphries SE, Talmud PJ MW. Lack of association between the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25(7):1627–31.
 55. Millaire A, Bouhour J. Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy – The CARDIGENE Study. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(1):29–35.
 56. Pascuzzo-Lima C, Mendible JC, Bonfante-Cabarcas RA. Polimorfismo I/D del gen de la enzima de conversión de angiotensina y progresión de la miocardiopatía chagásica. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(3):320–2.
 57. Rodríguez-Pérez JM, Cruz-Robles D, Hernández-Pacheco G, Pérez-Hernández N, Murguía LE, Granados J, Reyes PA, Vargas-Alarcón G. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism in Mexican patients with Chagas' disease. *Immunol Lett.* 2005;98(1):97–102.
 58. Criado L, Flórez O, Martín J, González CI. Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine.* 2012;57(3):398–401.

-
59. Mahjoub S, Mehri S, Bousaada R, Ouarda F, Zaroui A, Zouari B, Mechmeche R, Hammami M, Ben Arab S. Association of ACE I/D polymorphism in Tunisian patients with dilated cardiomyopathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2010;11(3):187–91.
 60. Felker GM, Shaw LK, O'Connor CM. A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(2):210–8.
 61. McKee.P., Castelli, W., McNamara.P., Kannel W. The Natural History of Congestive Heart Failure: The Framingham Study. *N Engl J Med.* 1971;285(26):1441–6.
 62. Espinosa R, Carrasco HA, Belandria F, Fuenmayor AM, Molina C, González R, Martínez O. Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973-1983). *Int J Cardiol.* 1985;8(1):45-56.
 63. Oliveira Jr WA. Atenção integral ao paciente chagásico. Uma proposta para o cuidar. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84(1):1-2.
 64. Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Omelianiuk M, Guzmán S, Moreno Barral J, Caeiro TF, Madoery RJ, Salomone OA. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Heart.* 2003;89(10):1186–90.
 65. Theodoropoulos TA, 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(1):22–9.

-
66. Beatriz M, Silva A, Virgínia A, Sá M, Silva HA, Galvão C. Synanthropic triatomines (Hemiptera, Reduviidae) in the state of Pernambuco, Brazil : geographical distribution and natural Trypanosoma infection rates between 2006 and 2007. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(1):60–5.
 67. Lanas F, Avezum A, Bautista LE, Diaz R, Luna M, Islam S, Yusuf S; INTERHEART Investigators in Latin America. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America : the INTERHEART Latin American study. *Circulation.* 2007;115(9):1067-74.
 68. Ayub-Ferreira SM, Mangini S, Issa VS, Cruz FD, Bacal F, Guimarães GV, Chizzola PR, Conceição-Souza GE, Marcondes-Braga FG, Bocchi EA. Mode of death on Chagas heart disease: comparison with other etiologies. a subanalysis of the REMADHE prospective trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2176.
 69. Childs, B. Genetic medicine: a logic of disease. Baltimore: Johns Hopkins University; 1999.
 70. Torres OA, Calzada JE, Beraún Y, Morillo CA, González A, González CI, Martín J. Lack of association between IL-6-174G/C gene polymorphism and Chagas disease. *Tissue Antigens.* 2010;76(2):131–4.
 71. Pissetti CW, de Oliveira RF, Correia D, Nascentes GAN, Llaguno MM, Rodrigues V. Association between the lymphotoxin-alpha gene polymorphism and chagasic cardiopathy. *J Interferon Cytokine Res.* 2013;33(3):130–5.
 72. Flórez O, Martín J, González CI. Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease. *Hum Immunol.* 2012;73(8):852–8.

73. Spies T, Bresnahan M, Strominger JL. Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(22):8955–8.
74. Beraún Y, Nieto A, Collado MD, González A, Martín J. Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. *Tissue Antigens*. 1998;52(1):81–3.
75. Sayed-Tabatabaei FA, Schut AF, Hofman A, Bertoli-Avella AM, Vergeer J, Witteman JC, van Duijn CM. A study of gene–environment interaction on the gene for angiotensin converting enzyme: a combined functional and population based approach. *J Med Genet*. 2004;41:99–103.
76. Oliveira EM, Alves GB, Barauna VG. Sistema renina-angiotensina : interação gene – exercício. *Rev Bras Hipertens*. 2003;10(2):125–9.
77. Mondry A, Loh M, Liu P, Zhu A-L, Nagel M. Polymorphisms of the insertion/deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension : surprising new findings and meta-analysis of data. *BMC Nephrol*. 2005;11:6–11.
78. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A, van Duijn CM, Witteman JC. ACE polymorphisms. *Circ Res*. 2006;98(9):1123–33.
79. Lima SG de, Hatagima A, Lucena N, Cavalcanti L. Sistema renina-angiotensina: é possível identificar genes de suscetibilidade à hipertensão? *Arq Bras Cardiol*. 2007;89(6):427–33.
80. Alves AJ, Eynon N, Goldhammer E. RAAS and adernergic genes in heart failure : function, predisposition and survival implications. *World J Cardiol*. 2010;2(7):187–97.

-
81. Zakrzewski-Jakubiak M, de Denus S, Dubé M, Bélanger F, White M, Turgeon J. Ten renin-angiotensin polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;65(5):742–51.
 82. McNamara DM, Holubkov R, Janosko K, Palmer A, Wang JJ, MacGowan GA, Murali S, Rosenblum WD, London B, Feldman AM. Pharmacogenetic linteractions between beta-blocker therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *Circulation*. 2001;103(12):1644–8.
 83. McNamara DM, Holubkov R, Postava L, Janosko K, MacGowan GA MM, Mathier M, Murali S, Feldman AM, London B. Pharmacogenetic Interactions between angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy and the angiotensin-converting enzyme deletion polymorphism in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(10):2019–26.
 84. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES HJ. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet*. 2003;33(2) :177–82.
 85. Deng X, Sabino EC, Cunha-neto E, Ribeiro AL, Ianni B, Mady C, Busch MP, Seielstad M; REDSII Chagas Study Group from the NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II Component International. Genome wide association study (GWAS) of Chagas cardiomyopathy in Trypanosoma cruzi seropositive subjects. *PLoS One*. 2013;8(11):e79629.
 86. Ferreira RC, Ianni BM, Abel LCJ, Buck P, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/“indeterminate” and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(3):407–11.