PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS – FASE II

Karina Mayumi Sakita (PIBIC-AF-IS/CNPq-FA-UEM), Pâmela Guimarães Reis, Amarilis Giaretta de Morais, Ana Maria Sell, Márcia Machado de Oliveira Dalalio, Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientadora), e-mail: jelvisentainer@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/ Departamento Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas – Imunologia – Imunogenética, 21.103.003

Palavras-chave: Doença de Chagas, Polimorfismos genéticos de citocinas, SNPs.

Resumo:

A doença de Chagas é causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi.* Vários estudos já relataram a importância do papel das citocinas no desenvolvimento e progressão da doença. Genes produtores das citocinas podem apresentar polimorfismos e conferir características de resposta imune interindividuais. Desta forma, propomos um estudo sobre os mecanismos da imunopatogenicidade do *T. cruzi* por meio da análise dos polimorfismos de genes reguladores das citocinas (TNF-alfa, IFN-gama, IL-6, IL-10 e TGF-beta1) em pacientes com doença de Chagas. Foram analisadas amostras de 156 pacientes com a doença de Chagas crônica e 220 controles, da região note/noroeste do Estado do Paraná. Não foi observada associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos estudados e a doença de Chagas.

Introdução

A doença de Chagas é uma antropozoonose causada principalmente pelo contato das fezes de triatomíneos hematófagos contaminadas pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina (WHO, 2015).

A doença de Chagas pode apresentar duas fases: fase aguda e crônica. Cerca de 30% dos pacientes na fase crônica da doença desenvolvem

desordens cardíacas e 10% alterações no sistema digestivo (principalmente esôfago e cólon), neurológico ou mistas.

Vários estudos já demonstraram que a interação entre parasito e hospedeiro podem encaminhar a diferentes cursos clínicos da doença. Sabe-se que a expressão de citocinas e sua cinética são fatores importantes para o desenvolvimento e progressão da doença, sendo que a produção de citocinas está sob o controle genético e que os polimorfismos desses genes podem conferir características de resposta imune interindividuais.

Desta forma, propomos um estudo sobre os mecanismos da imunopatogenicidade do *T. cruzi* por meio da análise do polimorfismo de genes reguladores das citocinas (TNF-alfa, IFN-gama, IL-6, IL-10 e TGF-beta1) em pacientes com doença de Chagas crônica.

Materiais e métodos

Foram analisadas amostras de 156 pacientes com a doença de Chagas crônica e 220 controles, adultos, de ambos os sexos, residentes em diferentes municípios do norte/noroeste do Estado do Paraná.

O DNA genômico de todas as amostras foi extraído por meio do método *salting-out*. A concentração e a pureza do DNA foi verificada no equipamento NanoDrop 2000® (Thermo Scientific). A genotipagem dos genes de citocinas estudados foi realizada pela técnica PCR-SSP (Invitrogen™, USA). A análise estatística foi realizada por meio do programa SNPStats: a web tool for the analysis of association studies (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats).

Resultados e Discussão

As frequências dos alelos e genótipos dos polimorfismos de genes de citocinas (*TNFα*, *IFNγ*, *IL6*, *IL10* e *TGFβ1*) estão descritos na Tabela 1. A distribuição dos genótipos em pacientes e grupo controle está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW). A análise de associação envolvendo pacientes com a doença de Chagas crônica (geral) e grupo controle não mostrou nenhuma diferença estatística significativa ($P < 0,05$), bem como, a análise com o grupo de pacientes com cardiopatia chagásica crônica e o grupo sem cardiopatia em relação a todos os polimorfismos de citocinas estudados, tanto para alelos, quanto para genótipos.

Diversos estudos têm reportado muitos marcadores genéticos de susceptibilidade e/ou proteção contra a doença de Chagas, dentre eles, estão os genes de citocinas, que também podem estar determinando o desenvolvimento das formas clínicas: cardíaca, digestiva ou mista.

Estudos realizados por Drigo *et al*. (2007), Torres *et al*. (2010) e Flórez et al. (2011) também não encontraram associação dos polimorfismo *TNFα* (-308G/A), *IL6* (-174G/C) e *IL10* (-1082G/A; -819C/T; -592C/A),

respectivamente, com a doença de Chagas e/ou suas formas clínicas. Por outro lado, Rodriguéz-Pérez *et al*. (2005), observou associação dos polimorfismos do gene *TNFα* (-308G/A; -238G/A) com pacientes que desenvolveram a cardiopatia chagásica. Costa e colaboradores (2009) encontraram que o polimorfismo da *IL10* (-1082G/A) também estava associado a pacientes com cardiopatia. Tais estudos apresentam resultados semelhantes ou diferentes, possivelmente devido às diferenças genéticas que diferentes populações e etnias apresentam em relação aos genes de citocinas e que podem contribuir para respostas imunológicas distintas.

Tabela 1. Frequência de genótipos e alelos para o polimorfismo de genes de citocinas

Genótipo/Alelo	Pacientes N=156 n(%)	Controles N=220 n(%)	Genótipo/Alelo	Pacientes N=156 n(%)	Controles N=220 n(%)
TNF (-308)	N = 156	N = 218	IL10 (-1082)	N = 150	N = 211
A/A	3 (2)	1 (0)	A/A	64 (43)	86 (41)
G/A	39 (25)	42 (19)	A/G	75 (50)	100 (47)
G/G	114 (73)	175 (80)	G/G	11 (7)	25 (12)
G	267 (86)	392 (90)	A	203 (68)	272 (64)
A	45 (14)	44 (10)	G	97 (32)	150 (36)
INFG (+874)	N = 151	N = 218	IL10 (-819)	N = 151	N = 212
A/A	52 (34)	84 (39)	C/C	62 (41)	97 (46)
A/T	81 (54)	103 (47)	C/T	69 (46)	100 (47)
T/T	18 (12)	31 (14)	T/T	20 (13)	15 (7)
A	185 (61)	271 (62)	C	193 (64)	294 (69)
T	117 (39)	165 (380)	T	109 (36)	130 (31)
IL6 (-174)	N = 152	N = 215	IL10 (-592)	N = 151	N = 210
C/C	12 (8)	13 (6)	A/A	16 (11)	15 (7)
G/C	62 (41)	104 (48)	C/A	78 (52)	104 (50)
C/C	78 (51)	98 (46)	C/C	57 (38)	91 (43)
G	218 (72)	300 (70)	C	192 (64)	286 (68)
C	86 (28)	130 (30)	A	110 (36)	134 (32)
TGFB1 (+869)	N = 151	N = 219			
C/C	32 (21)	44 (20)			
T/C	75 (50)	113 (52)			
T/T	44 (29)	62 (28)			
T	163 (54)	237 (54)			
C	139 (46)	201 (46)			

N, número de indivíduos; n, número de genótipos ou alelos.

Conclusões

Apesar de vários autores já terem encontrado associação entre os polimorfismos estudados e o desenvolvimento da doença de Chagas, nossos resultados não mostraram nenhuma diferença significativa quando comparamos pacientes e controles saudáveis. Sendo assim podemos observar que a genética da susceptibilidade da doença de Chagas e a cardiopatia chagásica crônica são altamente influenciadas pela complexa resposta imune do hospedeiro.

Agradecimentos

Fundação Araucária, CNPq/Capes, LIG-UEM.

Referências

COSTA, G. C., ROCHA, M. O. C., MOREIRA, P. R., MENEZES, C. A. S., SILVA, M. R., GOLLOB, K. J., et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **J Infect Dis**, v. 45, n.149, p. 53, 2009.

DRIGO, S. A., CUNHA-NETO, E., IANNI, B., MADY, C., FAÉ, K. C., BUCK, P., et al. Lack of association of tumor necrosis factor-∝ polymorphism with Chagas disease in Brazilian patients. **Immunol Lett**, v. 108, n. 109, p. 11, 2007.

FLÓREZ, O., MARTÍN, J., GONZÁLEZ, C. L. Interleukin 4, interleukin 4 receptor-∝ and interleukin 10 gene polymorphism in Chagas disease. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 506, p. 11, 2011.

TORRES, A. O., CALZADA, J. E., BERAÚN, Y., MORILLO, C. A. GONZÁLEZ, A., GONZÁLEZ, C. L., et al. Lack of association between IL-6 -174G/C gene polymorphism and Chagas disease. **Yissue Antigens,** v. 76, n. 131, p. 4, 2010.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) – facts sheet N°340 (Revisado em março de 2015). Disponível em: **<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.** Acesso em: 17 jun. 2015.