



## COMPARAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS SÉRICAS ENTRE PACIENTES COM A DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Talita Aparecida Tódora, (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Larissa Pires Mueller, Pâmela Guimarães Reis, Amarilis Giaretta de Moraes, Jeane Eliete Laguila Visentainer, Márcia Machado de Oliveira Dalalio (Orientadora), e-mail: mmodalalio@hotmail.com.

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

### Ciências Biológicas – Imunologia - Imunogenética.

**Palavras-chave:** doença de Chagas, citocinas séricas, quantificação

#### Resumo:

A doença de Chagas é uma antroponose parasitária, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É transmitida ao homem por um inseto vetor hematófago pertencente à subfamília *Triatominae*. A infecção com o *T. cruzi* ativa diversas vias do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro, levando a produção de várias citocinas. O objetivo deste estudo foi avaliar quais citocinas podem estar envolvidas no controle e na proliferação da doença de Chagas, por meio da análise das concentrações das citocinas séricas GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , em pacientes com a doença de Chagas crônica em relação ao grupo controle. A determinação dos níveis séricos de citocinas foi realizado utilizando Kits de Imunoensaio Human Cytokine 10-Plex Panel (Invitrogen Corp, CA, USA), e os dados foram analisados no software Xponent 3.1<sup>TM</sup>. Em relação aos níveis séricos das citocinas, houve maior concentração de IL-4 ( $p < 0,0001$ ), IL-5 ( $p < 0,0001$ ) e IL-10 ( $p < 0,0001$ ) entre os pacientes com a doença de Chagas quando comparados ao grupo controle. Nossos resultados mostraram que no grupo de pacientes, a maior produção de citocinas anti-inflamatórias foi associada a menor produção de citocinas pró-inflamatórias, o que sugere uma possível predominância da resposta Th2.

#### Introdução

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitido ao homem principalmente por um inseto vetor hematófago. A maioria dos pacientes entra em uma fase crônica da doença, conhecida como assintomática, porém, 20 a 40% dos





indivíduos infectados desenvolvem manifestações clínicas decorrentes de alterações cardíacas e/ou digestivas (RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O *T. cruzi* ativa múltiplas vias do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro, ativando a produção de várias citocinas. As citocinas são proteínas produzidas principalmente por linfócitos e macrófagos ativados, consideradas mediadores importantes na regulação da duração e intensidade das respostas inflamatórias, por meio da ligação a receptores específicos (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). Essas proteínas podem ser classificadas em citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) e pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), conforme suas ações. A oscilação entre as citocinas pró e anti-inflamatórias é essencial no avanço das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007). Diversos estudos demonstraram que as citocinas são importantes tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença de Chagas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações séricas das citocinas GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em pacientes com a doença de Chagas crônica e grupo controle em uma população da região sul do Brasil, na perspectiva de explicar a fisiopatologia da doença.

## Materiais e métodos

O projeto foi conduzido de acordo com as normas preconizadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá (UEM), protocolo nº 10.895. Foram coletadas amostras de sangue de pacientes portadores da doença de Chagas crônica, residentes nos municípios do norte/noroeste do Estado do Paraná, atendidos pelo SUS e encaminhados ao Laboratório de Chagas da Universidade Estadual de Maringá e ao Hospital das Clínicas de Londrina. O grupo controle foi composto de 57 indivíduos saudáveis, cônjuges de pacientes e residentes em casas de repouso. As amostras de sangue foram coletadas, os tubos centrifugados para obtenção do soro e as alíquotas congeladas a -80°C até o momento da dosagem das citocinas.

A determinação dos níveis séricos das citocinas GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foi realizada utilizando Kits de Imunoensaio Human Cytokine 10-Plex Panel (Life Technologies, Carlsbad, CA) de acordo com as recomendações do fabricante. O sinal de fluorescência foi verificado no equipamento Luminex® 200 e os dados analisados no software Xponent 3.1™. Para análise estatística foi utilizado o software BioEstat 5.0 em nível de significância de 5%. O teste D'Agostino Pearson foi empregado para determinar a normalidade dos dados e as comparações entre os grupos de pacientes e controles foram realizadas por meio do teste Mann-Whitney, sendo os resultados expressos como mediana.





## Resultados e Discussão

Foram analisadas amostras de 13 pacientes com a doença de Chagas crônica e 57 indivíduos controles. A média das idades dos pacientes foi 69,15 ( $\pm$  9,47) e a maioria dos indivíduos do gênero masculino (69,23%). Enquanto que, para o grupo controle a média das idades foi 72,61 ( $\pm$  14,15) e 54,39% dos indivíduos do gênero masculino.

Em relação aos níveis séricos das citocinas, houve maior concentração de IL-4 (61,0 pg/mL) ( $p < 0,0001$ ), IL-5 (9,9pg/mL) ( $p < 0,0001$ ) e IL-10 (31,2 pg/mL) ( $p < 0,0001$ ) entre os pacientes com a doença de Chagas quando comparados ao grupo controle. Foram observados níveis significativamente menores das citocinas IL-1 $\beta$  ( $p = 0,007$ ), IL-6 ( $p = 0,016$ ), GM-CSF ( $p < 0,0001$ ), IFN- $\gamma$  ( $p < 0,0001$ ) e IL-2 ( $p = 0,0004$ ) ao compararmos os grupos de pacientes e controles, mostrados na Tabela 1. Quanto à concentração das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-8 não houve diferenças significativas entre os grupos.

As citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) ativam o processo inflamatório, porém essa resposta é regulada pela ação das citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) que promovem a resposta Th2 e regulam a resposta Th1, estando envolvidas tanto na resistência quanto nos mecanismos relacionados à imunopatologia da doença (GAZZINELLI et al., 1992; FLOREZ et al., 2011). Nossos resultados mostraram que no grupo de pacientes, a maior produção de citocinas anti-inflamatórias foi associada a menor produção de citocinas pró-inflamatórias, o que sugere uma possível predominância da resposta Th2.

**Tabela 1-** Produção das citocinas entre pacientes com doenças de Chagas e grupo controle

		Pacientes com doença de Chagas	Grupo controle	P- valor <0,05
<b>INDIVÍDUOS</b>		13	57	
<b>CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS (pg/mL)</b>				
<b>IL-4</b>	(Min-Max) <sup>o</sup>	60,2-62,4	58,4-66,8	
	Mediana (Q1-Q3)*	61,0 (6,0-61,7)	58,4 (58,4-61,0)	<0.0001
<b>IL-5</b>	(Min-Max)	9,8-10,2	7,0-120,8	
	Mediana (Q1-Q3)	9,9 (9,9-10,0)	7,0 (7,0-9,9)	<0.0001
<b>IL-10</b>	(Min-Max)	30,9-33,2	30,2-39,2	
	Mediana (Q1-Q3)	31,2 (31,0-31,3)	30,3 (30,2-31,0)	<0.0001
<b>CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (pg/mL)</b>				
<b>IL-1 <math>\beta</math></b>	(Min-Max)	2,0-21,0	2,4-27,7	
	Mediana (Q1-Q3)	4,1 (3,1-5,7)	12,1 (3,4-12,1)	0.007
<b>IL-2</b>	(Min-Max)	6,3-12,7	6,1-15,0	
	Mediana (Q1-Q3)	6,6 (6,4-6,8)	15,0 (6,6-15,0)	0.0004
<b>IL-6</b>	(Min-Max)	5,7-10,7	3,2-223,6	
	Mediana (Q1-Q3)	6,5 (6,0-7,4)	7,3 (6,2-11,5)	0.016
<b>IL-8</b>	(Min-Max)	6,2-252,1	4,0-277,8	
	Mediana (Q1-Q3)	12,9 (8,3-50,4)	14,4 (13,0-47,1)	0.057
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	(Min-Max)	7,2-8,1	7,2-15,6	
	Mediana (Q1-Q3)	7,5 (7,5-7,8)	15,6 (7,5-15,6)	<0.0001
<b>TFN-<math>\alpha</math></b>	(Min-Max)	4,6-5,9	1,8-16,4	
	Mediana (Q1-Q3)	5,3 (4,6-5,3)	4,6 (4,5-9,1)	0.33
<b>GM-CSF</b>	(Min-Max)	16,0-16,9	16,0-24,3	
	Mediana (Q1-Q3)	16,0 (16,0-16,1)	24,3 (16,0-24,3)	<0.0001

\*(Q1-Q3) = Primeiro quartil e Terceiro quartil.

<sup>o</sup> Min-Max = Mínima e Máxima.





## Conclusões

Foi observada uma maior concentração de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5 e IL-10) e menor concentração de citocinas pró-inflamatórias (GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-2 e IL-1 $\beta$ ) em pacientes com a doença de Chagas em relação ao grupo controle. A concentração das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-8 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Estes dados foram obtidos de uma amostra cujo tamanho é pequeno, e suas formas clínicas ainda não foram determinadas, uma vez que nosso trabalho está em andamento.

## Agradecimentos

Agradecimentos ao Laboratório de Imunogenética da UEM e à Fundação Araucária pelo apoio e dedicação para realização do projeto.

## Referências

FLOREZ, O.; MARTIN, J.; GONZALEZ, C.I. Interleukin 4, interleukin 4 receptor-alpha and interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 506-511, 2011.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 2501-2506, 1992.

MARQUES, A.H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, p. 27-32, 2007.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

RASSI Jr. A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease, **The Lancet**, v. 375, n. 9723 p.1388-1402, 2010.

