



PERFIL DE CITOCINAS SÉRICAS EM PACIENTES COM A DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

FLÁVIA BAYS FAVARETO; PÂMELA GUIMARÃES REIS; CHRISTIANE MARIA AYO; AMARILIS GIARETTA DE MORAES; DIVINA SEILA DE OLIVEIRA; MÁRCIA MACHADO DE OLIVEIRA DALALIO; JEANE ELIETE LAGUILA VISENTAINER

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma doença endêmica, comum nas Américas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, cuja transmissão ao homem ocorre por meio do inseto hematófago da subfamília *Triatominae*. A adaptação do inseto a diferentes tipos de ambientes permite a continuidade da infecção, sendo que grande parte dos pacientes permanecem de forma assintomática, e o restante pode desenvolver uma das formas clínicas da doença (cardíaca, digestiva ou mista). Essa variabilidade de sintomas se deve tanto a atuação do sistema imunológico quanto a relação entre hospedeiro e patógeno, podendo esta ser originária de um desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2. O objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações de citocinas séricas (GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ , TNF- α) em pacientes com DC crônica e comparar com uma população controle, para isso foi realizado com 77 indivíduos, divididos em dois grupos: 14 pacientes diagnosticados com a DC, e 63 indivíduos no grupo controle (sem a DC), determinando, assim, os níveis de citocinas séricas através do Kit de Imunoensaio *Human Cytokine 10-Plex Panel*. Por meio desta análise, observamos maior concentração de IL-4, IL-5 e IL-10 e menores concentrações de IL-1 β , GM-CSF, INF- γ , IL-2 e IL-8 em pacientes com a DC, sem diferenças significativas para TNF- α e IL-6. Dessa forma, foi observada uma maior atuação da resposta Th2 na DC crônica, mostrando que existe uma possível relação importante entre o patógeno e o sistema imune do paciente, podendo inclusive, este ser o responsável pelas diferentes formas clínicas da doença.

Palavras-chave: Tripanossomíase americana; Interleucinas; Células Th2; Proteínas séricas; Sistema imunológico.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC), descoberta e descrita pelo médico Carlos Ribeiro Justiniano Chagas no início do século XX (BRASIL, 2020), tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*, na qual o vetor é um inseto triatomíneo, conhecido popularmente como bicho barbeiro (CANTERLE, 2020). Estima-se que de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas e 110 milhões estejam sob o risco de adquirirem a doença ao redor do mundo, com uma incidência de 28.000 casos por ano (POVEDA *et al.*, 2014). Apesar de todas as ações públicas realizadas com o objetivo de controle da DC, ela ainda se trata de um grande problema de saúde pública, estando presente em mais de 50% das microrregiões brasileiras (SANTOS *et al.*, 2020)

A transmissão da doença pode ocorrer através de cinco vias: vetorial, oral, vertical, transfusão de sangue ou acidental (BRASIL, 2021). Após a contaminação, a doença se

desenvolve duas fases: aguda e crônica. A fase aguda apresenta uma duração de 6 a 8 semanas e se apresenta com sintomas sistêmicos e inespecíficos (ANDRADE *et al.*, 2011), seguida pela fase crônica, que pode ser apresentada como indeterminada, na qual não há manifestações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas; ou sintomática, na qual pode ser cardíaca, digestiva ou mista (CHAMBELA, 2012).

A evolução da DC e suas diferentes formas clínicas podem ser explicadas através da interação entre a resposta imunológica do hospedeiro, mediada principalmente por citocinas, que são moléculas imunomoduladoras secretadas por várias células como os linfócitos T e os macrófagos, e o *T. cruzi* (COX *et al.*, 2001; POVEDA *et al.*, 2014).

Os linfócitos T podem ser classificados em linfócitos T *helper* 1 (Th1) que liberam IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e INF- γ , e, na DC, assumem um papel pró-inflamatório e os linfócitos T *helper* 2 (Th2) que liberam IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β , que na DC assumem um papel anti-inflamatório (CHAMBELA, 2012). O desbalanço entre esses dois grupos de linfócitos podem marcar o desenvolvimento e cronificação da doença (POVEDA *et al.*, 2014), além de poder explicar as diferentes formas clínicas da DC, como visto no estudo de Chambela (2012), em que a elevada concentração de IFN- γ e TNF- α e a baixa concentração de IL-10 e IL-4 estão relacionados com a forma cardíaca da doença e, em contrapartida, uma elevada concentração de IL-10 e níveis moderados de IFN- γ configuram a forma indeterminada.

A compreensão acerca das principais citocinas relacionadas à DC, bem como a sua relação com as manifestações clínicas e evolução da patologia são imprescindíveis para o conhecimento da atuação da doença e do patógeno, uma vez que é possível influenciar futuramente na elaboração de um plano terapêutico mais eficaz (POVEDA *et al.*, 2014). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as concentrações de citocinas séricas (GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ e TNF- α) em pacientes com DC crônica e a partir disso comparar a uma população controle.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Estadual de Maringá (012/2010-COPEP-UEM, CAAE 0296.0.093.000-09). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado por todos os participantes após os esclarecimentos a respeito da pesquisa.

Foram analisadas amostras de 14 pacientes com a DC crônica e 63 indivíduos controles. A média das idades dos pacientes foi 76,07 (\pm 11,12) e a maioria eram indivíduos do gênero feminino (57,14%). Para o grupo controle a média das idades foi 71,32 (\pm 13,77), sendo a maioria do gênero masculino (58,73%). As características dos pacientes e controles são mostradas na Tabela 1.

O diagnóstico sorológico da infecção por *T. cruzi* foi realizado por meio de dois testes: Ensaio Imunoenzimático (ELISA), usando o imunoensaio ELISA cruzi, e Imunofluorescência indireta (bioMerieux SA Brasil) seguindo as recomendações dos fabricantes para ambas as técnicas. A determinação dos níveis séricos de citocinas foi realizada utilizando Kits de Imunoensaio *Human Cytokine 10-Plex Panel* (Life Technologies, Carlsbad, CA) de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados foram analisados no *software Xponent 3.1™*. As amostras foram feitas em duplicata, e o padrão, o branco e as amostras foram distribuídas em placas de fundo V de 96 poços juntamente com os anticorpos de captura ligados a esferas de poliestireno. A placa foi incubada por 2 horas, sob agitação, sendo lavada em seguida com uma solução disponível no Kit, e o anticorpo biotilado foi adicionado, permanecendo incubada por 1 hora, sob agitação. Após esse período a placa foi lavada e incubada por 30 minutos após a adição do conjugado estreptavidina-peroxidase ligado às esferas de poliestireno. Antes da leitura da placa foi realizado mais um processo de lavagem, e em seguida, o sinal de

fluorescência foi verificado no equipamento Luminex® 200, onde os dados foram analisados.

Os resultados foram inseridos em uma planilha do Excel, e para esta análise foi utilizado o software *BioEstat 5.0* em nível de significância de 5%. Foram realizadas a determinação da normalidade dos dados e a comparação entre os grupos de pacientes e controles através dos testes Kolmogorov-Smirnov (KS) e Mann-Whitney, respectivamente, sendo os resultados expressos em mediana. Todos os testes utilizados foram realizados com intervalo de confiança de 95% e as diferenças estaticamente significativas foram consideradas para P-valor menor ou igual a 0,05.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características dos pacientes e controles são mostradas na Tabela 1 e os resultados da quantificação dos níveis séricos das citocinas em pacientes com a DC crônica e grupo controle são mostrados na Tabela 2.

Tabela 1 – Características dos pacientes com DC e controles

	Pacientes com DC N= 14	Controles N= 63
Sexo n (%)		
Masculino	6 (42,86)	37 (58,76%)
Feminino	8 (57,14)	26 (41,26%)
Idade		
Min.-Máx.	56-89	39-95
Média ± DP	76,07 ± 11,12	70,07 ± 12,52

DC: doença de Chagas; Min.: idade mínima; Máx.: idade máxima; DP: desvio padrão.

Tabela 2 – Níveis séricos de citocinas em pacientes com a doença de Chagas (DC) e grupo controle.

Citocinas (pg/mL)	Pacientes (N=14) mediana (IQR)*	Controle (N=63) mediana (IQR)*	P-valor <0,05
IL-1 BETA	2,97 (IQR, 1,18)	12,07 (IQR, 8,49)	0,0021
IL-10	31,15 (IQR, 0,33)	30,00 (IQR, 0,71)	0,0033
IL-6	6,44 (IQR, 1,33)	6,39 (IQR, 2)	0,4921
GM-CSF	16,04 (IQR, 0,16)	24,28 (IQR,8,23)	0,0017
IL-5	9,91 (IQR, 0,09)	7,00 (IQR,2,88)	0,0019
INF GAMA	7,57 (IQR, 0,3)	15,57 (IQR, 7,88)	0,0010
TNF ALFA	5,11 (IQR, 0,78)	4,95 (IQR, 5,78)	0,8070
IL-2	6,55 (IQR, 0,26)	14,95 (IQR,8,475)	0,0036
IL-4	60,95 (IQR, 0,73)	58,44 (IQR, 2,16)	0,0001
IL-8	8,83 (IQR, 3,02)	20,86 (IQR,47,425)	0,0007

*IQR: intervalo interquartil.

De acordo com os resultados obtidos, níveis significativamente maiores de IL-4 (mediana = 60,95 pg/mL; IQR = 0,73; $P < 0,0001$), IL-5 (mediana = 9,91 pg/mL; IQR = 0,09; $P = 0,0019$) e IL-10 (mediana = 31,15 pg/mL; IQR = 0,33; $P = 0,0033$) foram observados em portadores da DC quando comparados com o grupo controle. Níveis significativamente menores das citocinas IL-1 β (mediana = 1,18 pg/mL; IQR = 1,18; $P = 0,0021$), GM-CSF (mediana = 16,04 pg/mL; IQR = 0,16; $P = 0,0017$), IFN- γ (mediana = 7,57 pg/mL; IQR = 0,3; $P = 0,0010$), IL-2 (mediana = 6,55 pg/mL; IQR = 0,26; $P = 0,0036$) e IL-8 (mediana = 8,83 pg/mL; IQR = 3,02; $P = 0,0007$) foram observados ao compararmos os grupos de pacientes com a DC e indivíduos controles. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada em relação aos níveis das citocinas TNF- α e IL-6 quando os grupos foram comparados (Tabela 2).

O estudo permitiu a observação de uma maior concentração de IL-4, IL-5 e IL-10 em pacientes portadores da DC em relação ao grupo controle. Destaca-se que tais citocinas fazem parte da resposta Th2, havendo interferência nas respostas mediadas por Th1, além da supressão da ativação de macrófagos clássicos, em que ambos atuam na proteção contra infecções intracelulares. A IL-4 é, em parte, responsável pela supressão da ativação desses macrófagos, pois estimula a produção de citocinas como a IL-10 e a TGF- β , que inibem o desenvolvimento e a função da resposta Th1 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2013; CHAMBELA, 2012).

A IL-10 é uma interleucina reguladora, produzida através da resposta Th2 e macrófagos, que tem um papel no controle e desenvolvimento da doença (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2013; SALVADOR *et al.*, 2020). Assim como em nosso estudo, Salvador *et al.* (2020) observou maior concentração da IL-10 em pacientes com a DC comparado com indivíduos controle sem a doença. Poveda *et al.* (2014) e Souza *et al.* (2014) realizaram trabalhos semelhantes, com grupos de indivíduos com diferentes formas clínicas da DC, Poveda *et al.* (2014) observou maiores concentrações de IL-10 no grupo de pacientes com a forma não cardíaca da DC e, de forma semelhante, Sousa *et al.* (2014), obteve maiores concentrações desta interleucina em pacientes com a DC indeterminada.

No mesmo trabalho Sousa *et al.* (2014) observou que as citocinas com ação pró-inflamatória na DC, como IL-6, INF- γ e TNF- α , apresentavam maiores concentrações no grupo de pacientes com a miocardiopatia da DC, entretanto o autor observou que quando comparado apenas o grupo de indivíduos sem a doença e indivíduos com a doença na forma assintomática (indeterminada) nenhuma diferença significativa foi observada para a IL-6. Em nossa pesquisa, entre essas citocinas, houve apenas diferença significativa quanto ao INF- γ , que foi maior no grupo controle, o contrário do observado por Sousa *et al.* (2014).

Chambela (2012) descreve a importância da atividade do TNF- α e relata que uma maior concentração é frequentemente encontrada em pacientes com a miocardiopatia da DC, enquanto uma menor concentração é observada em pacientes com a forma indeterminada da doença, assim como observado por Sousa *et al.* (2014) e Vasconcelos *et al.* (2015). Em nosso trabalho não foram observadas diferenças significativas entre pacientes com a DC e controle, podendo, este resultado, ter sido influenciado e justificado pela não diferenciação entre as formas clínicas da doença e a maior atuação do TNF- α na forma cardíaca da DC.

Sousa *et al.* (2014) observaram maiores níveis da IL-1 β em pacientes com a DC, quando comparado com indivíduos sem a doença, porém sem diferenças significativas entre as diferentes formas clínicas. Em nosso trabalho, a concentração da IL-1 β foi maior nos indivíduos controle, essa divergência entre os trabalhos pode ser explicada pelo perfil da resposta Th2 dos pacientes com DC de nosso estudo, justificando a menor concentração de citocinas com características pró-inflamatórias.

Em nosso estudo foi observado maior concentração do GM-CSF em indivíduos do grupo controle, isso ocorre pois ele é responsável por melhorar a capacidade do macrófago em apresentar o antígeno, diminuindo a capacidade de replicação do *T. cruzi* (REIS *et al.*, 2000),

portanto, sua baixa concentração favorece a permanência do parasito no organismo, favorecendo a lesão através de outros mecanismos, como através da resposta com perfil Th2, sugerida pelos resultados de nossos estudos.

O trabalho mostrou uma polarização da resposta imunológica para um perfil Th2 em pacientes com a DC crônica, por meio das maiores concentrações de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-10. As diferenças observadas entre este estudo e a literatura dizem respeito à presença de maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com miocardiopatia decorrentes da DC, entretanto em nosso estudo não foi possível estratificar os grupos de acordo com as formas clínicas.

4 CONCLUSÃO

O estudo observou diferenças significativas entre as citocinas com atividade pró e anti-inflamatórias entre os pacientes com a DC e o grupo controle. Dessa forma, nosso trabalho condiz com a importância da atuação da resposta Th2 no desenvolvimento da doença, estando de acordo com o encontrado na literatura. Entretanto, foram observadas certas diferenças em relação às citocinas pró-inflamatórias quando comparado com outros estudos realizados. Essa diferença pode ter sido resultado da não estratificação dos grupos com as diferentes formas clínicas no estudo, já que os trabalhos em comparação realizaram este agrupamento. Portanto, acreditamos que as diferentes concentrações refletem no desenvolvimento e evolução do quadro da DC crônica, sendo essencial seu conhecimento para elucidação do quadro clínico do paciente, evolução e tratamento da doença, devendo conseqüentemente haver mais estudos sobre o assunto.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

ANDRADE, J. P. *et al.* I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 97, n. 2, p. 1-48, 2011. Supl. 3.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico: Doença de Chagas**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf. Acesso em: 13 fev. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doença de Chagas**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: Doença de Chagas- português (Brasil) (www.gov.br). Acesso em: 24 mar. 2021

CANTERLE, J. Secretaria de Saúde do Distrito Federal. **Doença de Chagas**. Brasília, DF: Secretaria de Saúde do Distrito Federal, 2020. Disponível em: <http://www.saude.df.gov.br/doenca-de-chagas/>. Acesso em 24 mar. 2021

CHAMBELA, M. C. *et al.* Fundação Oswaldo Cruz. **Avaliação das concentrações de citocinas séricas de pacientes em diferentes estágios da doença de Chagas**. 2012. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8165>. Acesso em: 8 fev. 2022.

COX, E. D. *et al.* Cytokine polymorphic analyses indicate differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. **Transplantation**, v. 72, n. 4, p. 720-726, ago. 2001.

POVEDA, C. *et al.* Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (A BENEFIT TRIAL sub-study). **PLOS ONE**, v. 9, n. 3: e91154, mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091154>.

REIS, M. M. *et al.* **Fatores de crescimento presentes no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 33, n. 6, p. 509-518, dez. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822000000600001>.

SALVADOR, F. *et al.* **Serum IL-10 levels and its relationship with parasitemia in chronic Chagas disease patients.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 102, n. 1, p. 159-163, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.4269%2Fajtmh.19-0550>.

SANTOS, E. F. *et al.* Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008445, ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008445>.

SOUSA, G. R. *et al.* **Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease.** PLOS ONE, v. 9, n. 3, p. e87082, mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087082>.

VASCONCELOS, R. H. T. *et al.* **Interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha serum levels in chronic Chagas disease patients.** Parasite Immunology, v. 37, n. 7, p. 376-379, fev. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12183>.